

ERIKA FERNANDA TORRES SAMICO FERNANDES CAVALCANTI

Toxoplasmose em suínos de criações de subsistência no estado de Pernambuco, Brasil: soroprevalência, isolamento e genotipagem de *Toxoplasma gondii*

RECIFE

2015

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL**

ERIKA FERNANDA TORRES SAMICO FERNANDES CAVALCANTI

**Toxoplasmose em suínos de criações de subsistência no estado de
Pernambuco, Brasil: soroprevalência, isolamento e genotipagem de
*Toxoplasma gondii***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Ciência Animal Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota

RECIFE

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

Toxoplasmose em suínos de criações de subsistência no estado de Pernambuco, Brasil: soroprevalência, isolamento e genotipagem de *Toxoplasma gondii*

Tese de Doutorado defendida por

ERIKA FERNANDA TORRES SAMICO FERNANDES CAVALCANTI

Aprovada em 26/02/2015

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota – Orientador

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dra. Flaviana Santos Wanderley

Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas – UNCISAL

Prof. Dr. Wagner José Nascimento Porto

Universidade Federal de Alagoas – UFAL

Prof. Dr. André Luiz Santos de Jesus

Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof. Dr. Jean Carlos Ramos da Silva

Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

Ficha catalográfica

C376t Cavalcanti, Erika Fernanda Torres Samico Fernandes
Toxoplasmose em suínos de criações de subsistência no
estado de Pernambuco, Brasil: soroprevalência, isolamento e
genotipagem de *Toxoplasma gondii* / Erika Fernanda Torres
Samico Fernandes Cavalcanti. – Recife, 2015.
105 f.: il.

Orientador: Rinaldo Aparecido Mota.
Tese (Doutorado em Ciência Animal Tropical) –
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de
Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2015.
Inclui referências, anexo(s) e apêndice(s).

1. PCR-RFLP 2. Genótipos 3. Bioensaio I. Mota, Rinaldo
Aparecido, orientador II. Título

CDD 636.089

DEDICATÓRIA

Aos meus amados pais Fernando Cordeiro Fernandes e Maria Lauricí Torres Samico Fernandes. Vocês são pessoas essenciais na trajetória da minha vida. Obrigada pela dedicação, paciência, ensinamentos, entusiasmo, carinho e cuidado. A eles, todo o meu amor e gratidão!

AGRADECIMENTOS

"A sorrir... eu pretendo levar a
Cartola

Sobretudo a DEUS, por tudo que tem realizado em minha vida, pois sem Ele nada conseguiria. A Ele toda honra, toda glória e todo o meu louvor.

Aos meus pais, Lauricí e Fernando, por me apoiaram incondicionalmente neste trabalho e em todos os meus projetos de vida; sempre serão minha melhor referência, meu horizonte. Vocês são os melhores pais do MUNDO, agradeço a DEUS por ter me escolhido para ser filha de pessoas MARAVILHOSAS.

A minha amada irmã Marcela, pelo seu carinho, pela cumplicidade, apoio nos momentos difíceis e por todas as nossas horas de descontração. Muito obrigada por tudo, você também faz parte deste trabalho, amo-te, minha querida irmã.

Ao meu amor, amigo, confidente e marido Benôni, pela paciência e carinho nos meus momentos difíceis, sempre me apoiando em todos os aspectos. Amo-te!

Aos meus AMORES, meus filhos CAIO e LUCAS. Obrigada por vocês existirem e me fazer uma pessoa melhor a cada dia. Amo vocês com todas as minhas forças.

Aos meus familiares por serem sempre a minha base de carinho, em especial a minha querida avó, Josefa, minha vovó Tota, a vovó Bisa dos meus filhotes, por sempre está em oração, agradecendo as maravilhas que JESUS tem feito em minha vida.

Aos meus sogros, D. Marlene e seu Pereira, por todo apoio durante a realização desse trabalho.

Ao meu orientador, o meu "Pai da Rural", Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota, pelos dez anos de convivência, dedicação, trabalho e acima de tudo ensinamentos. Obrigada por ser para mim mais do que um orientador, encontrei no senhor um amigo, exemplo de pessoa e de profissional. Meu eterno agradecimento!

Ao Prof. Dr. Leonildo Galiza, pela amizade, conselhos, descontração, "quebra de galhos" e por todo carinho.

Ao Médico Veterinário Mauro Bezerra por todo o apoio, conselhos e amizade durante a realização desse trabalho. Obrigada amigo!

A todos que fazem parte do Laboratório de Protozoologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual de Londrina - UEL, na pessoa do Prof. Dr. João Luis Garcia, pelas análises das amostras na PCR-RFLP.

Aos Professores do Departamento de Medicina Veterinária Andréa Alice, Andréa Paiva, Jean Carlos, Leucio Alves, Frederico Maia, Aderaldo de Freitas, Mércia Barros, Elizabeth Sampaio, José Wilton pelo constante apoio e carinho.

Ao Médico Veterinário Júnior Mário pela realização das análises estatísticas e pela amizade.

Aos amigos André Mota, Renata Pimentel, Pomy Kim por me ajudarem na realização da PCR e por serem meus anjos da guarda nessa caminhada. Muito mais que companheiros de laboratório, vocês se tornaram grandes amigos. Obrigada!

Ao Médico Veterinário Jonatas Campos pela amizade, disponibilidade e ajuda essencial na construção da árvore filogenética. Sua ajuda chegou no momento que eu mais precisava. Muito obrigada!

Aos amigos do Laboratório de Doenças Infecto-contagiosas Érica Moraes, Pomy Kim, Pedro Paulo, Orestes, André Santos, André Mota, Givanildo, Renata Pimentel, Renata, Grasiene, Camila, Débora Rochely, Adriano, Rafael, Júlio, Fernando Kim, Fernando Mota, Aline, Gabriela, Adriane, Poly, Alexandre, Atzel, Sílvio, Débora Viegas... enfim a todos que fizeram parte deste laboratório nos dez anos de convivência diária. Muito obrigada!

À dona Guiomar, dona Cleidinha pelo constante apoio e amizade.

Aos meus amigos e amigas pela compreensão em muitos momentos de ausência.

Aos Médicos Veterinários e os funcionários dos abatedouros das cidades visitadas que facilitaram a coleta do sangue e tecidos dos suínos.

À coordenação da Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa de pesquisa.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

A todos os animais utilizados, suínos e camundongos.

Enfim a todos aqueles que me conhecem na íntegra e, por isso, sei que sempre serão os meus verdadeiros amigos.

Obrigada!

Agrada-te do Senhor, e ele satisfará os desejos do teu coração. Entrega o teu caminho ao Senhor, confia nele e o mais ele fará.

Salmo 37: 4-5

“Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe. Só levo a certeza de que muito pouco eu sei, que nada sei...”

Almir Sater

“Viver e não ter a vergonha de ser feliz, cantar e cantar e cantar a beleza de ser um eterno aprendiz...”

Gonzaguinha

RESUMO

Toxoplasma gondii é um protozoário coccídeo intracelular obrigatório causador da toxoplasmose, uma importante zoonose. O estudo da prevalência deste parasito em suínos é de grande importância uma vez que a carne suína é uma das principais via de transmissão para os humanos, quando consumida crua ou mal cozida. Objetivou-se neste estudo determinar a soroprevalência de anticorpos, isolar e caracterizar geneticamente *Toxoplasma gondii* em suínos de criações de subsistência no Estado de Pernambuco, Brasil. No primeiro grupo de estudo avaliaram-se 224 amostras de sangue e tecidos de suínos abatidos em matadouros municipais para a presença de anticorpos anti- *T. gondii* na técnica da reação de Imunofluorescência indireta (RIFI) utilizando o ponto de corte ≥ 64 . Os animais soropositivos tiveram seus tecidos analisados pelas técnicas de bioensaio em camundongos, histopatologia, imunohistoquímica (IHQ) e reação em cadeia da polimerase (PCR). Dos animais amostrados, 38,0% (85/224) foram positivos na RIFI com títulos variando de 64 a 1024. Ocorreu associação significativa em relação à idade dos animais e a soropositividade ($p < 0,001$). Na histopatologia, não foram observadas lesões associadas à infecção por *T. gondii* nos tecidos avaliados e na IHQ também não foram obtidas imunomarcações positivas. A PCR dos tecidos dos suínos positivos na sorologia revelou 14,1% (12/85) amostras positivas e no bioensaio em camundongos, 28,0% (5/18) das amostras foram positivas. O segundo grupo de estudo foi realizado com o objetivo de se conhecer os genótipos circulantes do *T. gondii* no estado de Pernambuco. Inicialmente foi feita uma triagem dos animais positivos na prova sorológica (RIFI) em 54,3% (50/92) e os tecidos dos animais positivos seguiram para a bioprova. Foram utilizados 15 *pools* de tecidos onde se obteve um isolado. Este isolado obtido foi caracterizado na PCR-RFLP utilizando 11 marcadores genéticos (SAG1, SAG2, *alt*SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c228, c292, L358, PK1 e APICO). Foram utilizadas as cepas de *T. gondii* RH, ME49 e VEG que pertencem aos tipos I, II e III respectivamente, como padrão na caracterização genotípica do isolado suíno. Após a análise genética identificou-se o genótipo #65(ToxoDB) considerado uma cepa atípica, sendo este o primeiro registro desse genótipo em suínos no mundo. Os resultados obtidos nesse estudo permitiram concluir que a infecção por *Toxoplasma gondii* ocorre nos suínos no estado de Pernambuco e que medidas estratégicas e integradas devem ser adotadas para prevenir e controlar as infecções em suínos e humanos na região estudada.

Palavras-chave: genótipos, PCR-RFLP, abatedouro, bioensaio, prevalência, saúde pública

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular coccidian protozoan that causes the toxoplasmosis, an important zoonosis. The study of the prevalence of this parasite in pigs have great importance since pork is one of the main sources of infection for humans when consumed raw or undercooked. This study aimed to determine the prevalence of antibodies, isolate and genetically characterize the *Toxoplasma gondii* in subsistence creations of pigs in the State of Pernambuco, Brazil. In the first study it was evaluated 224 blood samples and tissues from pigs slaughtered in municipal slaughterhouses for the presence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies by Indirect Immunofluorescence Assay (IFA). There was a significant relationship regarding the age of the animals and seropositivity ($p < 0.001$). The positive animals had their tissues analyzed by bioassay techniques in mice, Histopathology, Immunohistochemistry (IHC) and Polymerase Chain Reaction (PCR). Of animals sampled, 38.0% (85/224) were positive in the IFA with titles ranging from 64 to 1024. In the histopathology, it was not observed injuries associated to toxoplasmosis in the evaluated tissues and in the IHC it was not obtained positive immunostaining. The PCR of pig tissues showed 14.1% (12/85) positive samples and in the mouse bioassay, 28.0% (5/18) of the samples were positive. The second study was realized with the purpose of discovering the genotypes of *T. gondii* in the region. It was realized a screening of positive animals in the serological tests, then, the tissues of positive animals were used for bioassay. Fifteen pools of tissues were used, of which, was obtained one isolate. The isolate obtained was characterized by RFLP-PCR, using 11 genetic markers (SAG1, SAG2, *alt*SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c228, c292, L358, PK1 e APICO). It was used the RH, ME49 and VEG strains of *T. gondii*, that belong to types I, II and III respectively as standard in genetic characterization of isolated swines. After this genetic analysis, it was identified genotype #65 (ToxoDB), considered an atypical strain and also the first record of this genotype in pigs worldwide. The results of this study allow to conclude that *Toxoplasma gondii* is installed in pig herds in the state of Pernambuco and strategic and integrated measures should be taken around the prophylaxis of this disease, to prevent and control the infections in pigs and humans in the studied region.

Keywords: genotypes, PCR-RFLP, slaughterhouse, bioassay, prevalence, Public health

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão de Literatura

Figura 1 - Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii* 23

Figura 2 - Ciclo de transmissão da toxoplasmose humana 24

Artigo 1

Figura 1 - Mesorregiões de Pernambuco 53

Artigo 2

Figura 1 - Análise filogenética do isolado de *T. gondii* obtido neste estudo (círculo vermelho), utilizando como referência as cepas: MAS, GT1, TgRsCr, TgCgCa1, Tg CatBr64, TgCatBr5, PTG e CTG. 74

LISTA DE TABELAS

Revisão de Literatura

Tabela 1 - Frequência de suínos positivos para *Toxoplasma gondii* em diferentes Estados do Brasil 26

Tabela 2 – Percentual de isolamento de *T. gondii* a partir de tecidos de suínos no Brasil 32

LISTA DE TABELAS

Artigos Científicos

Artigo 1

Tabela 1 - Isolamento de *Toxoplasma gondii* de suínos destinados ao consumo humano no Estado de Pernambuco, Brasil. 57

Tabela 2 – Análise dos fatores associados à infecção por *Toxoplasma gondii* em relação à sorologia nos suínos abatidos para o consumo humano no estado de Pernambuco, Brasil. 58

Tabela 3 - Análise dos fatores associados à infecção por *Toxoplasma gondii* em relação à PCR nos suínos abatidos para o consumo humano no estado de Pernambuco, Brasil. 58

Artigo 2

Tabela 1 - Segmentos de DNA utilizados na análise de RFLP, com os iniciadores para amplificação e as endonucleases de restrição de polimorfismo. 72

Tabela 2 - Caracterização genotípica de isolado de *T. gondii* obtido de suínos abatidos em Pernambuco, Brasil. 73

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

\geq	Maior ou igual
®	Marca registrada
°C	Grau Celsius
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CNPq	Conselho Nacional de Pesquisa
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
ELISA	Imunoabsorção Enzimática
g	Gramas
HA	Hemaglutinação
HAI	Hemaglutinação Indireta
HD	Hospedeiro Definitivo
HE	Hematoxilina-Eosina
HI	Hospedeiro Intermediário
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IgG	Imunoglobulina classe G
IgM	Imunoglobulina classe M
IHQ	Imunohistoquímica
MAD	Método de Aglutinação Direta
MAT	Aglutinação Direta Modificada
mL	Mililitro
mM	Micromolar
OIE	World Organisation for Animal Health
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
SAM	Soroaglutinação Microscópica
UV	Ultra-violeta
μ L	Microlitro
μ M	Micromolar

APÊNDICES

Questionário sobre as condições de criação dos suínos

Quadro 1 – Resultados do exame histopatológico em tecidos de suínos abatidos no Agreste Pernambucano, 2013.

Quadro 2 – Resultados do exame histopatológico para tecidos de camundongos utilizados no bioensaio, Pernambuco 2013

ANEXOS

Normas das revistas (Instruções aos autores)

Artigo 1 - The Journal of Parasitology

Artigo 2 – Acta Tropica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	20
2.1 Geral	20
2.2 Específicos	20
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	21
3.1. Breve histórico sobre a descoberta do <i>Toxoplasma gondii</i>	21
3.2 O agente etiológico.....	21
3.3 Biologia de <i>Toxoplasma gondii</i>	22
3.4 Formas de transmissão	23
3.5 Epidemiologia	24
3.6 Diagnóstico	27
3.7 Importância da toxoplasmose na saúde pública.....	30
3.8 Diversidade biológica e genética do <i>T. gondii</i>	31
3.9 Técnicas de genotipagem.....	32
3.10 Referências.....	37
4. ARTIGOS	48
4.1 ARTIGO - Ocorrência de <i>Toxoplasma gondii</i> em suínos de criações de subsistência: soroprevalência e bioensaio.....	49
4.2 ARTIGO - Detecção molecular, genotipagem e análise filogenética de isolado de <i>Toxoplasma gondii</i> em suínos abatidos para o consumo humano na região nordeste do Brasil.	67
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	81
APÊNDICES	82
ANEXOS.....	87

1 INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma zoonose de distribuição mundial, causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii* que é capaz de infectar os animais homeotérmicos que podem manifestar diferentes formas da doença. Destaca-se, ainda, pelo importante papel na saúde pública com casos mais graves da doença nos indivíduos imunocomprometidos e gestantes soronegativas, além das perdas causadas na pecuária, principalmente decorrente dos problemas reprodutivos.

No Brasil, milhões de animais destinados à alimentação são abatidos para o consumo humano por ano, sendo os suínos uma das fontes mais prováveis de infecção por *Toxoplasma gondii* pela ingestão da carne contendo cistos teciduais do parasito (DUBEY et al., 2012).

O Brasil ocupa a quarta posição na produção mundial de suínos com mais de 36,7 milhões de cabeças registradas em 2013 (IBGE, 2013). Nos últimos anos, a produção de carne suína no Brasil teve uma expansão significativa. Conforme dados do IBGE, houve um crescimento médio anual em torno de 8%. A região Nordeste é responsável por aproximadamente 3,94 milhões de cabeças, o equivalente a 11,2% do rebanho nacional e o estado de Pernambuco concentra 7% desses animais (IBGE, 2013).

Estudos recentes têm demonstrado a importância da genotipagem dos isolados de *T. gondii*, considerando a possibilidade de haver relação dos diferentes genótipos com a patogênese causada em humanos e animais.

O isolamento do agente por meio da infecção experimental em camundongos (bioensaio) e a tipificação genética da cepa são importantes ferramentas para auxiliar na determinação da patogenicidade e avaliação da evolução clínica do parasitismo. Segundo a literatura consultada, Pernambuco não possui um mapeamento da ocorrência dos diferentes genótipos de *Toxoplasma gondii*. Um diagnóstico mais acurado do risco epidemiológico que representam os genótipos circulantes no estado se tornará uma importante ferramenta para um melhor conhecimento da enfermidade em Pernambuco, propiciando condições para a adoção correta de medidas preventivas.

Dessa forma, objetivou-se conhecer a distribuição dos diferentes genótipos e caracterizar as cepas do *T. gondii* isolado a partir de suínos abatidos para o consumo humano no estado de Pernambuco por meio do bioensaio em camundongos e caracterização genotípica pela técnica de PCR-RFLP “multilocus”, utilizando marcadores de alta resolução para ampliar os conhecimentos sobre a diversidade genética do *T. gondii* no estado.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Estudar a presença e distribuição da infecção por *Toxoplasma gondii* em suínos de criações de subsistência no estado de Pernambuco, Brasil.

2.2 Específicos

- Determinar a prevalência de anticorpos anti- *T. gondii* pela técnica de Imunofluorescência Indireta (RIFI) em suínos de criações de subsistência no estado de Pernambuco, Brasil.

- Identificar a presença do DNA do *T. gondii* pela Reação em cadeia da Polimerase (PCR) em tecidos de suínos de criações de subsistência no estado de Pernambuco, Brasil.

- Avaliar a viabilidade do *T. gondii* nos tecidos de suínos de criações de subsistência no estado de Pernambuco, Brasil por meio da bioprova em camundongos.

- Identificar os genótipos circulantes de *T. gondii* em tecidos de suínos de criações de subsistência no estado de Pernambuco, Brasil pela a técnica Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos gerados por Enzimas de Restrição (PCR-RFLP).

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Breve histórico sobre a descoberta do *Toxoplasma gondii*

Em 1908, Charles Nicolle e Louis Manceaux, comunicaram a Academia de Ciências Francesa a descoberta de um parasito intracelular no baço e fígado de um roedor proveniente do norte da África e comumente empregado em pesquisas de laboratório no Instituto Pasteur, o *Ctenodactylus gundi*. Estes pesquisadores acreditaram que o organismo encontrado tratava-se de uma forma particular de *Leishmania*, denominando-o *Leishmania gondii*. No mesmo ano, Afonso Splendore observou o mesmo parasito em um coelho de laboratório em São Paulo, Brasil. Posteriormente, a espécie foi descrita com base na morfologia (Toxo = arco; Plasma = vida) e no hospedeiro em que foi encontrado (*Ctenodactylus gundi*) (DUBEY, 2010).

A primeira vez que foi diagnosticado em suínos naturalmente infectados foi em Ohio, Estados Unidos, em um rebanho que apresentava elevada mortalidade em todas as faixas etárias (FARREL et al., 1952). No Brasil, o primeiro relato da toxoplasmose na espécie suína foi feito por Silva (1959) no estado de São Paulo e, posteriormente, por Schenk, Lima e Viana (1976) no estado de Minas Gerais. Os autores isolaram *T. gondii* no diafragma e cérebro de suínos clinicamente saudáveis, abatidos para o consumo humano.

Nos anos de 1954 a 1956, levantaram-se as primeiras hipóteses sobre a possibilidade de transmissão horizontal por meio da ingestão de cistos teciduais em carnes cruas de suínos (WEINMAN; CHANDLER, 1954; 1956), sendo esta hipótese confirmada posteriormente por Jacobs et al. (1960).

3.2 O agente etiológico

Toxoplasma gondii pertence ao Filo Apicomplexa, Classe Conoidasida, Subclasse Coccidia, Ordem Eucoccidii e Sub-família Toxoplasmatinae (LEVINE, 1988). Este protozoário é a única espécie representante do gênero *Toxoplasma*.

É considerado um dos patógenos mais bem sucedidos tanto em termos de número de hospedeiros, quanto na porcentagem de animais infectados ao redor do mundo (SU et al., 2010). Ao longo de sua evolução, *T. gondii* desenvolveu uma ampla variedade de vias de transmissão, tendo como hospedeiros intermediários provavelmente todos os animais

endotérmicos e como hospedeiros definitivos, os membros da família Felidae (TENTER et al. 2000). Estima-se que aproximadamente um terço da população humana no mundo esteja infectada na fase crônica (PENG et al., 2011).

3.3 Biologia de *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii é um protozoário intracelular obrigatório de baixa especificidade, pois infecta provavelmente qualquer animal endotérmicos e vários tipos celulares (DUBEY, 2010). Apesar dos inúmeros estudos realizados desde o início do século XX, somente na década de 1960 o ciclo biológico de *T. gondii* foi elucidado. Por meio das observações e demonstrações dos estágios infecciosos desse parasito nas fezes dos felídeos foi possível a constatação da transmissão a outros hospedeiros (TENTER et al., 2000; DUBEY, 2010).

Nos hospedeiros, o parasito passa por duas fases distintas em seu ciclo de vida (Figura 1), sendo uma assexuada (extraintestinal) e outra sexuada (enteroepitelial). A fase extraintestinal ocorre em todas as espécies de sangue quente e a fase enteroepitelial se desenvolve exclusivamente no epitélio intestinal do hospedeiro definitivo (felídeos), onde irá ocorrer a formação de oocistos que são liberados ainda não esporulados nas fezes. A esporulação ocorre no ambiente em um prazo de um a cinco dias, dependendo das condições de temperatura e umidade. Os oocistos esporulados contêm dois esporocistos com quatro esporozoítos cada (TENTER et al., 2000; DUBEY et al., 2004; HILL et al., 2004).

Por ser um organismo obrigatoriamente intracelular e móvel, invade as células nucleadas e multiplica-se por divisão binária simples e endodiogenia sob as formas de taquizoítos (multiplicação rápida) e bradizoítos (forma de multiplicação lenta), estes últimos no interior dos cistos tissulares (LUZON et al., 1997; MEIRELES, 2001). Os esporozoítos são encistados e passam pelos enterócitos e células caliciformes do epitélio intestinal até alcançarem a lâmina própria. A partir de então, os parasitos podem infectar todos os tipos celulares do hospedeiro, exceto hemácias, passar por multiplicação celular e formar os taquizoítos. Estes se multiplicam assexuadamente de forma intensa nas células do hospedeiro (HILL et al., 2004; DUBEY, 2010).

A taxa de invasão e multiplicação varia de acordo com a cepa do parasito e com a célula infectada. Para tentar driblar a resposta imune, os parasitos então se diferenciam em bradizoítos, resultando na formação de cistos teciduais (TENTER et al., 2000; SIBLEY, 2008; DUBEY, 2010).

A resposta imune do hospedeiro não pode, no entanto, eliminar uma infecção já estabelecida, já que os cistos teciduais persistem por vários anos. Alguns podem se romper em algum momento da vida do hospedeiro e os bradizoítos liberados são, em sua maioria, destruídos. Caso haja imunossupressão, a infecção pode ser reativada com a disseminação de bradizoítos e sua conversão em taquizoítos (DUBEY et al., 2004).

O ciclo de *T. gondii* pode ser mantido apenas entre os hospedeiros intermediários através de expansões clonais do parasito provenientes da ingestão de cistos teciduais de um hospedeiro infectado (TENTER et al., 2000; ROBERT-GANGNEUX E DARDÉ, 2012).

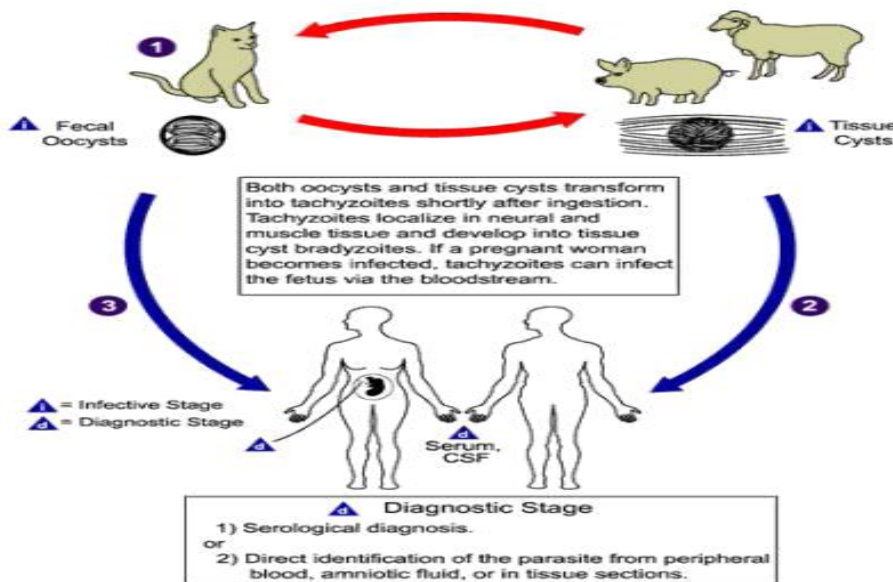


Figura 1 – Ciclo de vida do *T. gondii* (TENTER et al., 2000)

3.4 Formas de transmissão

Todas as três formas morfológicas de *T. gondii* são infectantes tanto para hospedeiros definitivos quanto para intermediários. A infecção ocorre principalmente por três vias sendo elas, a ingestão oral de oocistos infectantes no ambiente (água e alimentos), ingestão oral de cistos teciduais nas vísceras e carnes dos hospedeiros intermediários e transmissão transplacentária por meio dos taquizoítos (Figura 2) onde as duas primeiras são consideradas transmissão horizontal e a última vertical. Taquizoítos foram encontrados, ainda, em fluídos

corpóreos como sangue, urina, sêmen e leite o que amplia as fontes de infecção pelo agente (DUBEY, 1991; TENTER et al., 2000; MORAES et al., 2010; BEZERRA et al., 2012).

Dubey et al. (2012) sugerem que as duas formas de transmissão mais comuns são: a ingestão acidental de oocistos e o consumo de carnes com cistos teciduais de *T. gondii*.

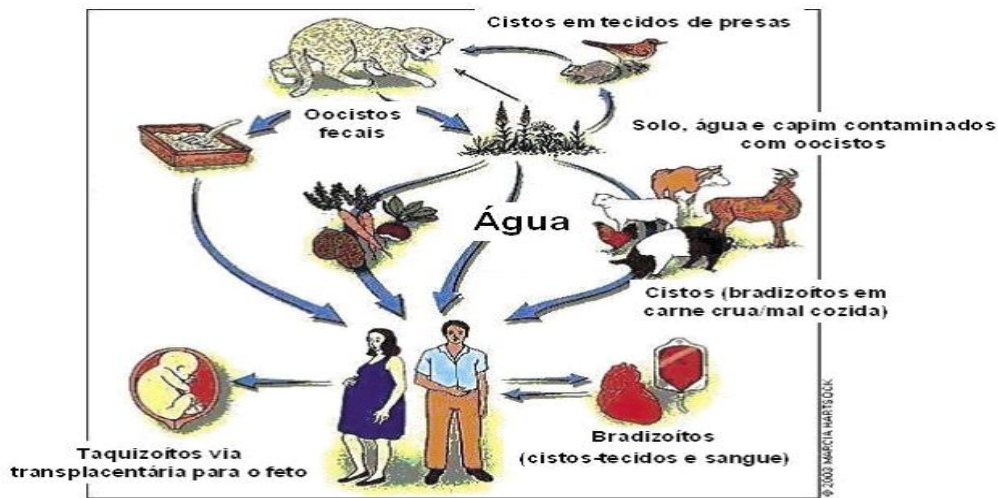


Figura 2 - Ciclo de transmissão da toxoplasmose humana (Lynfield ; Guerina, 1997).

3.5 Epidemiologia

Estudos epidemiológicos indicaram que os gatos são essenciais na perpetuação do ciclo de vida de *T. gondii*, pois a infecção é rara ou ausente em áreas desprovidas de gatos (VALENÇA et al., 2011; FEITOSA et al., 2014). Outro estudo, no estado do Tennessee, EUA estimou que a chance de os suínos se infectarem com *T. gondii* é 2,6 vezes maior nas propriedades com presença de gatos do que naquelas onde estes estão ausentes (ASSADI-RAD et al., 1995).

Embora pesquisadores tenham observado que a presença de gatos reflete o grau de contaminação do ambiente por oocistos (VIDOTTO et al., 1990), no estudo realizado por Valença et al. (2011) em granjas suinícolas sobre os fatores de risco para a toxoplasmose, não houve correlação estatística em relação aos soropositivos criados em propriedades que possuíam gatos. O mesmo fato foi relatado por Trevisani et al. (2013) em um levantamento sobre os fatores de risco para espécie suína.

Para Hill e Dubey (2002), os gatos podem eliminar milhões de oocistos nas fezes após a ingestão de apenas um bradizoíto contido em cisto tecidual de um animal infectado. A

grande maioria das pesquisas considera que os oocistos presentes nas fezes destes felinos sejam os responsáveis pela contaminação da água, ração e instalações, constituindo-se em importantes disseminadores do agente nos rebanhos suínolas (ASSADI-RAD et al., 1995; DUBEY et al., 1995; WEIGELL et al., 1995; LEHMANN et al., 2003).

Felídeos selvagens como leão, leopardo, jaguar, lince, puma e outros também podem eliminar oocistos nas fezes. Alguns pesquisadores encontraram sorologia positiva nesses animais em zoológicos e os oocistos eliminados por esses animais podem ser fonte de disseminação de *T. gondii* não só para outros animais do zoológico, mas também para tratadores e visitantes, principalmente crianças (JONES E DUBEY, 2010).

Os oocistos no ambiente são bem resistentes, até mesmo ao congelamento, desinfetantes, tratamentos como cloração, ozônio e raios ultravioleta (JONES E DUBEY, 2010). Podem contaminar água, alimentos e o solo e têm sido apontados como uma importante via de transmissão da toxoplasmose (DU et al., 2012).

A distribuição do parasito ocorre de maneira desigual pelo mundo. Geralmente são encontrados em regiões úmidas e com temperaturas elevadas que permitem a sobrevivência dos oocistos no ambiente (SAWADOGO et al., 2005). Os oocistos podem permanecer viáveis por 32 dias numa temperatura de 35°C e por 9 dias a 40°C e por apenas um dia a 45°C (KAWAZOE, 2005).

O risco de transmissão associado à ingestão de carne suína varia entre os diferentes países de acordo com os hábitos alimentares locais e com a prevalência da doença entre os animais criados para consumo. Em um estudo multicêntrico na Europa estimou-se que o consumo de carne é responsável por 30 a 63% dos casos de infecção humana, enquanto o contato com o solo representou de 6 a 17% dos casos (COOK et al., 2000; MIURA, 2014).

A prevalência da infecção em suínos pode variar entre regiões conforme os hábitos sócios culturais, fatores geográficos e climáticos (CADEMARTORI et al., 2014).

A toxoplasmose é um sério problema para as criações de suínos e pequenos ruminantes, nas quais causa prejuízos econômicos por estar associada ao aborto e infertilidade, além de diminuir a produção dos animais infectados (CARLETTI et al., 2005; CLEMENTINO ANDRADE et al., 2013).

Em suínos, pesquisas sorológicas têm relatado uma distribuição mundial de *T. gondii*. A prevalência varia entre os suínos de sistemas de confinamento e os porcos caipiras ou orgânicos. A questão central que afeta a soroprevalência é a exposição de suínos aos oocistos e a roedores infectados. Há um consenso geral de que a infecção em suínos não será impedida

a não ser que o contato com oocistos e roedores seja escasso (DUBEY, 2010). Nos Estados Unidos, uma taxa de 23,0% em 11.229 animais destinados ao consumo DUBEY et al. (2010). No Brasil, estudos sorológicos sobre a prevalência da infecção em suínos foram realizados em diferentes regiões (Tabela 1).

Tabela 1- Frequência de suínos positivos para *T. gondii* em diferentes estados do Brasil

Unidade Federativa	Autor	Ano	Técnica utilizada	Nº Animais	F.R (%)
Rio Grande do Sul	FIALHO; ARAÚJO	2003	RIFI	240	34,00%
Paraná	CARLETTI et al.	2005	RIFI	424	4,00%
Pernambuco	CAPORALI et al.	2005	RIFI	259	4,70%
São Paulo	SANTOS et al.	2005	MAT	286	17,00%
São Paulo	OLIVEIRA et al.	2007	MAT	550	20,10%
Paraná	MOURA et al.	2007	RIFI	117	8,50%
Minas Gerais e São Paulo	LANGONI et al.	2007	MAT	262	21,60%
Paraná	MILLAR et al.	2008	RIFI	408	25,50%
Bahia	BEZERRA et al.	2009	ELISA	465	18,20%
Alagoas	VALENÇA	2009	RIFI	342	26,90%
Santa Catarina	PERDONCINI	2010	HI	505	17,20%
Paraná	PIASSA et al.	2010	RIFI	606	13,40%
Pernambuco	FERNANDES et al.	2011	RIFI	327	9,78%
Pernambuco	SAMICO FERNANDES et al.	2012	RIFI	305	12,50%
Santa Catarina	TREVISANI et al.	2013	RIFI	533	6,50%
Rio Grande do Sul	CADEMARTORI et al.	2014	RIFI	100	3,60%

Legenda: Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI), Teste de Aglutinação Direta Modificada (MAT)

Kijlstra et al. (2008) relataram que os suínos podem se infectar pela ingestão de água e ração contaminados com fezes de felídeos contendo oocistos de *T. gondii*, ou ainda pela ingestão de roedores e seus cadáveres, visto que o suíno é um animal onívoro. Outra forma de transmissão seria a via transplacentária. A soroprevalência de *T. gondii* varia de acordo com alguns fatores, tais como o controle de roedores e métodos de descarte de suínos mortos. Quando não há um programa de controle de roedores na propriedade realizado por profissionais qualificados e quando carcaças suínas são enterradas ou deixadas para compostagem, aumenta-se o risco de infecção (HILL et al., 2011).

Entre os fatores relacionados à ocorrência da infecção em suínos, o sexo dos animais foi apontado por alguns autores (BONA et al., 2006; MOURA et al., 2007; BEZERRA et al., 2009), sendo mais frequente nas fêmeas do que em machos. A toxoplasmose normalmente é

assintomática no suíno adulto, no entanto, algumas cepas de *T. gondii* podem causar infecção clínica associada com abortos, natimortos, mortalidade de suínos com menos de três semanas de vida, infertilidade (GOULART et al., 2013). A manifestação desses sinais clínicos na toxoplasmose animal depende principalmente da resposta imune do hospedeiro infectado e da virulência da cepa de *T. gondii* (FRAZÃO – TEIXEIRA et al., 2011).

A idade dos animais é um fator importante na avaliação do risco pelo consumo de carne suína e seus derivados, pois a carne *in natura* é oriunda dos animais jovens, enquanto os embutidos são produzidos com carne de animais de descarte, normalmente de maior idade e frequentemente mais infectados por apresentarem um maior tempo de exposição ao parasito (SILVA et al., 2010).

Carletti et al. (2005) apontaram maior frequência de positivos em matrizes, quando comparadas aos animais de terminação e Bezerra et al. (2009) verificaram que a positividade foi maior em animais oriundos de abates clandestinos. Desta maneira, o sistema de criação (intensiva x extensiva) e o grau de tecnificação (DA SILVA et al., 2008) são apontados como fatores de risco para a infecção de suínos.

3.6 Diagnóstico

O diagnóstico da toxoplasmose baseia-se na história clínica, nos dados epidemiológicos e nos sinais clínicos do rebanho (AVERBACH et al., 1980), porém nem sempre esses são evidentes. O diagnóstico laboratorial da toxoplasmose é fundamental, uma vez que a infecção pode assumir quadros clínicos facilmente confundidos com outras enfermidades, dificultando a tomada de medidas específicas de tratamento e controle (VIDOTTO, 1990).

O diagnóstico desta protozoose pode ser realizado por métodos indiretos como os sorológicos, ou pela pesquisa direta de cistos e taquizoítos em tecidos, através de cortes histológicos, seja corados pela Hematoxilina e Eosina (HE), Imunohistoquímica (IHQ) ou ainda por meio da Prova biológica (Bioensaio), inoculando-se tecido do animal suspeito em camundongos. Em cortes histológicos corados pela HE torna-se difícil a identificação do *T. gondii*, pois o parasito não possui características tintoriais próprias que permitam distingui-lo nitidamente das células adjacentes, podendo ser confundido com núcleos ou fragmentos nucleares que se coram de forma semelhante (ROSA et al., 2001). Porém, alguns autores relataram a observação dos cistos em cortes histológicos corados com HE em órgãos como,

por exemplo, em músculo cardíaco de gerbis (*Meriones unguiculatus*) (FRAZÃO – TEIXEIRA et al., 2002).

A confirmação da infecção deve ser feita por meio de testes sorológicos e/ou biópsia de linfonodos (LAPPIN, 1994). Os cistos de *T. gondii* são microscópicos e, portanto, não são detectados pelo serviço de inspeção do abate. Por isso os levantamentos são realizados através de exames sorológicos que detectam anticorpos nesses animais, indicativos de uma infecção pré-existente (CAMARGO, 1974).

A detecção de anticorpos séricos é o método mais frequentemente utilizado na determinação da infecção por *T. gondii* em suínos. A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o teste aglutinação direta modificada (MAT) reconhecem anticorpos dirigidos contra antígenos de superfície do parasito, enquanto que a hemaglutinação (HA) e o ELISA, normalmente reconhecem também os antígenos citoplasmáticos, tendendo a detectar anticorpos mais tardios (HILL et al., 2006). Segundo Dubey et al. (1995) o MAT é um teste de elevada sensibilidade para suínos, com elevada especificidade analítica, sendo menos sensível apenas que o ELISA.

Fialho e Araújo (2002) compararam o teste de hemaglutinação indireta com a RIFI em suínos, encontrando porcentagem de concordância de resultados positivos e de negativos, nas duas técnicas de 48,1% e 94,3%, respectivamente, resultando em uma porcentagem de concordância total de 78,7%. Afirmaram ainda que para fins de diagnóstico a RIFI foi superior à HI e que esta reação tem sua principal indicação em inquéritos epidemiológicos.

A RIFI tem como vantagens ser altamente específica e sensível (DUBEY, 1990; FRENKEL, 1997). É considerada de fácil realização, praticamente isenta de problemas de infecção acidental para os laboratoristas e não requer organismos vivos (URQUHART et al., 1998).

Outra vantagem que a RIFI-IgG apresenta é a capacidade de evidenciar anticorpos dirigidos para os antígenos de superfície do *T. gondii*, sendo mais precoce quando comparado a HAI. Os títulos revelados na RIFI ascendem ao redor do oitavo ou 10º dia pós-infecção e na HAI, somente após o 14º dia. A sua desvantagem está na necessidade de equipamentos especiais e caros, como o microscópio de imunofluorescência e as anti-gamaglobulinas específicas para cada espécie (LARSSON, 1989).

As principais técnicas utilizadas para o isolamento do *T. gondii* são o bioensaio e a inoculação do material suspeito em cultura celular. O bioensaio é a técnica mais utilizada e é considerado o padrão ouro para detectar a viabilidade do parasito, realizando a inoculação de

material suspeito em camundongos (*Mus musculus*). Quando o material biológico é suspeito de conter cistos teciduais de *T. gondii*, recomenda-se a digestão prévia do tecido em pepsina ou tripsina onde irá ocorrer a dissolução da parede dos cistos, liberando os bradizoítos e aumentando a eficácia do isolamento (DUBEY, 1998; DUBEY, 2010).

O tecido digerido pode ser inoculado pelas vias sub-cutânea (SC), intraperitoneal (IP) ou oral (*per gavage*) e cada uma destas vias tem suas vantagens. A IP é a mais útil para isolar *T. gondii* a partir de amostras estéreis; a via SC é melhor para isolamento em amostras com possível contaminação bacteriana, já a oral é ideal para isolar de fezes de gatos (DUBEY, 2010).

Dubey et al. (2002) sugeriram, em um novo método, a avaliação da virulência dos isolados de *T. gondii* durante o próprio isolamento primário em camundongos. A mortalidade e o tempo decorrido até a morte dos camundongos devem ser observados por um período de 30 dias. Os isolados virulentos apresentam 100% de mortalidade entre os camundongos infectados; os isolados não virulentos apresentam 100% de sobrevivência entre os camundongos infectados, enquanto os de virulência intermediária apresentam taxas de sobrevivência intermediárias.

Tendo em vista a necessidade de conhecimento aprofundado sobre virulência, infectividade, suscetibilidade e outros aspectos biológicos e epidemiológicos do parasito, vários estudos buscam caracterizar *T. gondii* em nível molecular.

A descoberta da reação em cadeia da polimerase (PCR) por Kary Mullis em 1985 fez surgir uma nova perspectiva no diagnóstico para vários microrganismos, incluindo o *T. gondii*. A PCR veio suprir a carência de métodos diagnósticos precisos e sensíveis. É importante lembrar que a técnica molecular para detectar o DNA do *T. gondii* não substitui os métodos tradicionais (SILVA et al., 2010). A associação de dois ou mais métodos de diagnóstico indica o real estágio da infecção (KOMPALIC-CRISTO et al., 2005).

A biologia molecular na toxoplasmose suína apresenta muitas utilidades, tanto na pesquisa, seja em estudos experimentais ou observacionais, assim como no diagnóstico em suínos domésticos e javalis (RICHOMME et al., 2009). Tal ferramenta tem sido muito utilizada em estudos transversais, acompanhamento de tratamento e de vacinas, epidemiologia molecular, evolução populacional e diagnóstico clínico (DA SILVA et al., 2009). Várias técnicas de PCR foram desenvolvidas para o diagnóstico da toxoplasmose, utilizando diversos tipos de amostras clínicas, como nested-PCR, multiplex-PCR e polimorfismo de comprimento

do fragmento de restrição (RFLP-PCR), real time-PCR, análise de microsátélites e sequenciamento, entre outras (SU et al., 2006).

Dessa forma, a detecção molecular do agente apresenta grande importância e, dependendo das técnicas utilizadas, permite caracterizar a estrutura populacional clonal e analisar a evolução populacional do parasito.

3.7 Importância da toxoplasmose na saúde pública

Do ponto de vista da Saúde Pública, a toxoplasmose merece uma atenção especial. Dentre as enfermidades consideradas zoonóticas ela vem ganhando destaque, pois cerca de 30% da população mundial está infectada por *T. gondii*, mas as prevalências variam muito entre os países e mesmo entre diferentes comunidades de uma mesma região (TENTER et al., 2000; ZHU et al., 2008; DUBEY, 2010).

A espécie suína tem merecido especial atenção dos epidemiologistas por ser uma importante fonte de infecção à população humana devido à longevidade dos cistos teciduais nas carcaças dos animais de produção (ALVARADO-ESQUIVEL et al., 2011). Os alimentos contaminados com oocistos oriundos das fezes dos gatos, a via transplacentária, leite não pasteurizado, ovos, carnes que foram preparadas com cocção inadequada e que continham cistos são outras possíveis vias de transmissão citadas para a espécie humana (HILL e DUBEY, 2002; DUBEY et al., 2012b).

Os representantes da família Felidae são importantes fatores de riscos para a infecção dos suínos. Mateus-Pinilla et al. (1999) vacinaram gatos por via oral em fazendas em Illinois, EUA, com cepas de *T. gondii* que imunizam os felinos contra a eliminação de oocistos nas fezes. O resultado deste estudo demonstrou que a soroprevalência da toxoplasmose em suínos e roedores reduziu significativamente nessas fazendas.

Da Cunha et al. (2012) afirmaram que devido a importância da carne suína como via de transmissão de *T. gondii* para os humanos, estudos têm sido realizados com o objetivo de desenvolver uma vacina para diminuir a formação de cistos teciduais na carne dos suínos e assim prevenir a infecção em humanos.

Portanto, algumas medidas de controle devem ser adotados como a redução ou eliminação dos gatos da propriedade, manter o controle de roedores nas instalações, eliminar fêmeas sorologicamente positivas, evitar fornecer alimentação humana aos animais, incinerar as carcaças dos animais infectados (LAPPIN, 1994).

3.8 Diversidade biológica e genética do *T. gondii*

Apesar da presença de um ciclo sexuado e de uma distribuição mundial, a estrutura populacional de *T. gondii* foi descrita inicialmente como altamente clonal, exibindo uma baixa diversidade genética. Esta foi a conclusão dos estudos de genética de isolados da Europa e dos Estados Unidos que agruparam o parasito em três genótipos (I, II, e III) equivalentes às linhagens clonais, estáveis no tempo e no espaço (DARDÉ et al., 1992; HOWE e SIBLEY 1995; AJZENBERG et al., 2002; SU et al., 2006). Estes três genótipos são o possível resultado de cruzamentos genéticos naturais entre tipos parentais altamente semelhantes. A progênie teria se expandido dando origem a uma população clonal nos últimos 10.000 anos (ROBERT-GANGNEUX E DARDÉ, 2012).

Existem possíveis explicações para a existência de uma estrutura populacional clonal de *T. gondii* em estado selvagem. Primeiro, o ciclo sexual não é obrigatório para a transmissão, que também pode ocorrer pela ingestão de estágios intermediários através da alimentação carnívora ou onívora (TENTER et al., 2000; SIBLEY et al., 2009). Em segundo lugar, um único organismo haplóide pode se diferenciar para completar o ciclo de vida no felídeo. Como a co-infecção com múltiplas cepas é provavelmente um evento raro, os felídeos normalmente liberariam oocistos contendo descendência geneticamente idêntica. Uma vez que uma complexidade genética limitada é estabelecida, ela seria passível de ser mantida (SIBLEY et al., 2009).

Estudos recentes de isolados do *T. gondii* utilizaram novos marcadores moleculares e a América do Sul vem demonstrando uma maior variabilidade genética do que a descrita em estudos anteriores (FERREIRA et al., 2006; DUBEY et al., 2008; RAGOZO et al., 2010; FRAZÃO-TEIXEIRA et al., 2011, BEZERRA et al., 2012; CLEMENTINO ANDRADE et al., 2013, BARROS et al., 2014).

Tabela 2- Isolamento de *T. gondii* a partir de tecidos de suínos no Brasil

Ano	Local	Número Examinad o	Positivo		Material Avaliado
			Númer o	%	
1969	São Paulo	25	8	32,00%	Diafragma
1969	São Paulo	73	5	6,85%	Musculatura
1969	São Paulo	10	0	0,00%	Embutido *
1977	Minas Gerais	159	1	0,63%	Diafragma
1977	Minas Gerais	98	4	4,08%	Cérebro
1992	Londrina	117	23	19,66%	Musculatura
1992	Londrina	36	8	22,22%	Cérebro
2004	Botucatu	70	0	0,00%	Embutido *
2005	Londrina	149	1	0,67%	Pool de tecidos
2005	São Paulo	149	13	8,72%	Embutido *
2006	Rio de Janeiro	12	6	50,00%	Pool de tecidos
2011	Rio de Janeiro	19	5	26,32%	Pool de tecidos
2013	Rio Grande do Norte	18	5	27,78%	Pool de tecidos
2014	Paraná	26	18	69,23%	Pool de tecidos

* Embutidos são produtos fabricados a partir de diversos tecidos suínos

No entanto, para o melhor esclarecimento da história evolutiva de *T. gondii* em diferentes escalas de tempo, um número maior de amostras de diferentes continentes ainda é necessário. A expansão geográfica de genótipos idênticos em todos os continentes, tanto clonais como atípicos pode ser facilitada pelas atividades humanas, tais como transportes e intercâmbios, assim como a migração de aves (ROBERT-GANGNEUX E DARDÉ, 2012).

A compreensão da diversidade genética de *T. gondii* é importante para avaliar a epidemiologia molecular do parasito, já que variações locais na estrutura genética são altamente relevantes para compreender características como a transmissão, imunogenicidade e patogênese (SIBLEY et al., 2009).

3.9 Técnicas de genotipagem

Os primeiros estudos de tipagem foram desenvolvidos na década de 90. Esses estudos foram baseados na eletroforese de isoenzimas e ocorreu a análise de 35 isolados de *T. gondii* por isoenzimas permitindo assim a identificação de cinco zimodemas (DARDÉ et al., 1992).

Estas análises necessitavam de um grande número de parasitos purificados, fato que inviabilizava o uso prático na rotina laboratorial (SIBLEY et al., 2009).

Mais tarde, Howe et al. (1997) desenvolveram um sistema de tipagem de *T. gondii* baseado na análise de restrição de fragmentos do gene SAG2, amplificado por nested PCR. Este método identifica genótipos de cepas das três linhagens clonais descritas anteriormente. Entretanto, a genotipagem de cepas baseadas em apenas um *locus* possui limitações, pois a utilização de um único marcador genético limita o poder de distinção dos isolados de *T. gondii*, não sendo possível detectar recombinações ou alelos atípicos (DARDÉ, 2004; AJZENBERG et al., 2005; SU et al., 2006).

Diante da possibilidade e da necessidade, pesquisadores desenvolveram métodos mais sensíveis na detecção de polimorfismos genéticos entre os diferentes isolados do parasito, a fim de avaliar a real diversidade da população de *T. gondii*, podendo assim encontrar fatores genéticos que possam influenciar na virulência do parasito, para assim poder entender eventuais mecanismos de seleções genotípicas de acordo com a espécie hospedeira e tentar relacionar o genótipo do parasito às manifestações clínicas da toxoplasmose (DARDÉ, 2004; FERREIRA et al., 2006).

Com o passar dos anos foram elaborados segmentos de DNA curtos e repetitivos que tendem a ocorrer na região não codificante, os chamados marcadores para microsatélite. O uso destes marcadores para a tipagem de *T. gondii* é sensível, confiável e passível de análises de alto rendimento (DARDÉ et al., 2004). Contudo, Sibley et al. (2009) afirmaram que esses marcadores são também altamente polimórficos e podem ser influenciados pela contaminação do DNA do hospedeiro, o que constitui uma fonte significativa de variabilidade.

Foram desenvolvidas várias técnicas moleculares utilizadas para estudar a diversidade genotípica dos isolados de *T. gondii* como a amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD), polimorfismo do comprimento de fragmentos gerados por enzimas de restrição (PCR-RFLP), marcadores microsatélites (sequências simples repetidas- SSR) e sequenciamento (HOWE E SIBLEY, 1995; FERREIRA et al., 2004; YAI et al., 2009; ZHOU et al., 2009; SILVA et al., 2011). Nesse contexto Su et al. (2006) elaboraram um conjunto de marcadores para PCR-RFLP que fornecem maior resolução para a genotipagem de *T. gondii*, cada um deles capaz de distinguir os três alelos.

O polimorfismo pela RFLP tem sido amplamente utilizado para a genotipagem de *T. gondii* por ser uma ferramenta simples e prática (SU et al., 2006). Marcadores de RFLP passam por amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR), seguido de digestão

com enzimas de restrição específicas e visualização em gel de eletroforese (SIBLEY et al., 2009). Em resumo, a PCR-RFLP é a análise do polimorfismo dos fragmentos de DNA devido à clivagem do DNA feita por enzimas de restrição que reconhecem uma sequência específica de quatro a oito pares de bases. Possui capacidade de diferenciar os alelos atípicos (u-1 e u-2) e detectar a combinação dos alelos de diferentes arquétipos; é uma técnica de fácil execução e tem sido empregada nas pesquisas para genotipagem (SU, ZHANG E DUBEY, 2006; FRAZÃO-TEIXEIRA et al., 2011).

A utilização da técnica PCR-RFLP multilocus representa um grande desafio em relação às amostras de campo (infecção natural), pois essas amostras são limitadas quanto ao volume e principalmente a quantidade de DNA. Pensando em minimizar esse problema, Su et al. (2010) também desenvolveram o Multiplex multilocus nested PCR-RFLP (Mn-PCR-RFLP), método que emprega 11 marcadores genéticos, incluindo SAG1, SAG2, SAG2-alt, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1 e Apico. Nesta técnica, os marcadores são pré-amplificados por PCR multiplex utilizando iniciadores externos numa única reação e os produtos são utilizados como molde para amplificar cada marcador individualmente por nested-PCR (SU et al., 2010).

Estudos diretos das regiões genômicas, através da técnica do sequenciamento, revelam a diversidade genética completa, incluindo polimorfismos de um único nucleotídeo e pequenas inserções e deleções. Tal fato faz com que essa técnica detecte uma maior diversidade genética do que outros métodos. Tendo como exemplo, um elevado grau de polimorfismo foi observado no Locus GRA6 por sequenciamento, enquanto que na análise por PCR-RFLP detectaram apenas os três grupos I, II e III (SIBLEY et al., 2009). Contra o sequenciamento, estão os custos, e mesmo que esses custos caíam a um nível desejado, a fim de se obter a sequência genômica de todos os isolados, todos seriam considerados únicos e, ainda assim, seriam necessários critérios que permitissem comparações para classificar os isolados (SIBLEY et al., 2009).

A partir do uso dos conjuntos de marcadores associados às técnicas de sequenciamento e, em especial o PCR-RFLP, aplicados a isolados de diferentes hospedeiros em diferentes regiões geográficas, ficou definitivamente evidenciada a grande diversidade genética deste parasito na América do Sul.

Estudos realizados nos EUA e Portugal revelaram a partir da técnica de PCR-RFLP, com a utilização de 10 marcadores moleculares, a predominância das linhagens clonais II e

III, e que as cepas atípicas são raras nos EUA (DUBEY E SU, 2009; VELMURUGAN et al., 2009).

Diante da utilização da PCR-RFLP com marcadores, começou-se a perceber uma grande diferença genética para os genótipos do Brasil em relação aos da América do Norte e Europa. Enquanto estes últimos apresentam-se predominantemente clonais tipos I, II ou III, com maior predominância dos genótipos II e III (DARDÉ et al., 1992; HOWE E SIBLEY, 1995; AJZENBERG et al., 2002 a, b), os genótipos do Brasil são geneticamente mais diversificados, com praticamente ausência de genótipos clonais (DUBEY et al., 2002; LEHMANN et al., 2006; BELFORT-NETO et al., 2007; DUBEY et al., 2007; DUBEY et al., 2008). Não só os genótipos brasileiros apresentaram combinações dos alelos presentes nas linhagens clonais I, II e III, como também novos alelos ausentes em outras regiões do mundo, chamados atípicos. O tipo clonal II, raro no Brasil, com amplo número de isolados, principalmente da América do Norte e Europa (HOWE E SIBLEY, 1995) foi descrito no país por DUBEY et al. (2010), SILVA et al. (2011), MACEDO et al. (2012) e BARROS et al. (2014) que descreveram a presença do tipo clonal II em isolados de galinhas de subsistência em Fernando de Noronha, ovinos abatidos no estado de São Paulo e bovinos abatidos no estado de Santa Catarina, bem como em pombos silvestres no estado do Paraná respectivamente.

Em relação à genotipagem de isolados de suínos, Frazão-Teixeira et al. (2011) obtiveram cinco isolados de *T. gondii* a partir de 35 amostras de tecidos no Rio de Janeiro e quatro genótipos foram identificados. A análise de DNA multilocus mostrou que cada linhagem possuía uma combinação única de alelos ainda não descritos na América do Sul. Recentemente, estudos sobre caracterização de *T. gondii* a partir de suínos abatidos para consumo humano no Estado do Rio Grande do Norte revelaram cinco isolados que apresentavam quatro genótipos diferentes, um deles já descrito para outros hospedeiros da mesma região (CLEMENTINO ANDRADE et al., 2013). Ainda no Nordeste, a partir da análise de 20 cérebros de suínos foram obtidos 11 isolados que não se enquadraram nas linhagens clonais I, II e III e nem mesmo nos genótipos previamente descritos em suínos no Brasil (BEZERRA et al., 2012).

Os trabalhos de genotipagem de isolados de *T. gondii* no Brasil ainda são escassos, sobretudo na região Nordeste e também no estado de Pernambuco. Devem ser realizados mais estudos nas diferentes regiões do país e também com diferentes espécies animais com o

objetivo de compreender a diversidade molecular e a circulação do *Toxoplasma gondii* (DUBEY et al., 2008; SU et al., 2006; SU et al., 2010; BEZERRA et al., 2012).

3.10 Referências

AJZENBERG D, BANULS AL, TIBAYRENC M, DARDÉ ML 2002. Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. *International Journal Parasitology* 32: 27–38.

AJZENBERG, D.; DUMÈTRE, A.; DARDÉ, M.L. 2005. Multiplex PCR for typing strains of *Toxoplasma gondii*. *Journal Clinical Microbiology* 43: 1940-1943.

ALVARADO-ESQUIVEL, C.; GARCÍA MACHADO, C.; ALVARADO-ESQUIVEL D.; GONZÁLEZ-SALAZAR, A.; BRIONES-FRAIRE, C.; VITELA-CORRALES, J.; VILLENA, I.; DUBEY, J.P. 2011. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic pigs in Durango State, Mexico. *The Journal of Parasitology*. v. 97, p. 616- 619.

ASSADI-RAD, A.M., NEW, J.C., PATTON, S. 1995. Risk factors association with transmission of *Toxoplasma gondii* to sows kept in different management systems in Tennessee. *Veterinary Parasitology*, v. 57, p. 289-297.

AVERBACH, S.; IANOVSKY, J.F.; SCHMUNIS, G.A. Importância clínica no diagnóstico oportuno da toxoplasmose. Diferenciação sorológica das formas agudas e crônicas. *Imunoserum Técnica Ltda*. 1980.

BARROS, L.D.; TARODA, A; ZULPO, D.L.; DA CUNHA, I.A.L.; SAMMI, A.S.; CARDIM, S.T.; MIURA, A. C.; SU, C.; MACHADO, R.Z.; VIDOTTO, O.; GARCIA, J.L. 2014. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from eared doves (*Zenaida auriculata*) in Brazil. *Brazil Journal Veterinary Parasitology*, 23:443-448.

BELFORT NETO, R. V., NUSSENBLATT, L., RIZZO, C., MUCCIOLI C., SILVEIRA, R., NUSSENBLATT, A., KHAN L. D., SIBLEY, R., BELFORT, N. 2007. A alta prevalência de genótipos incomuns de infecção pelo *Toxoplasma* em amostras de carne de porco carne de Erechim, RS, Brasil. *Academia Brasileira Ciência*, 79:111-114.

BEZERRA, R. A.; PARANHOS, E.B.; E. B.; DEL'ARCO, A.E.; ALBUQUERQUE, G.R. 2009. Detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos criados e abatidos no Estado da Bahia, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 18:78-80.

BEZERRA, R. A.; CARVALHO, F. S.; GUIMARÃES, L. A.; ROCHA, D. S.; MACIEL, B.M.; WENCESLAU, A.A.; LOPES, C.W.G.; ALBUQUERQUE, G.R. 2012. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs intended for human consumption in Brazil. *Veterinary Parasitology*. 189:153-161.

BONNA, I. C. F.; FIGUEIREDO, F.B.; COSTA, T.; VICENTE, R.T.; SANTIAGO, C.A.D.; NICOLAU, J. L.; NEVES, L.B.; MILLAR, P.R.; SOBREIRO, L.G.; AMENDOEIRA, M.R.R. 2006. Estudo soropidemiológico da infecção por *Toxoplasma gondii* em suínos e frangos, para abate, em região rural do Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, 13:186-189.

CADEMARTORI, B.G. ; SANTOS, L.M.J.F. ; OLIVEIRAA, F.C. ; QUEVEDOA, P. ; OLIVEIRAA, P.A.; RAMOS, T.S.; ROCHA, A.S.R.; RUAS, J.L.; FARIAS, N.A.R. 2014. Isolation and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* in naturally infected (rustic farm) pigs in southern Brazil Veterinary Parasitology 203:207–211

CAMARGO, M.E. 1974. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 6:116-118.

CAPORALI, E. H. G., A. V. SILVA, A.O. 2005. MENDONÇA, AND H. LANGONI. Comparação de métodos para determinação da prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos dos Estados de São Paulo e Pernambuco—Brasil. Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar. 8: 19–24.

CARLETTI, R. T.; FREIRE,R.L.;SHIMADA, M.T.; RUFFOLO,B.B.; BEGALE,L.P.; LOPES,F.M.R.L.; NAVARRO, I.T. 2005. Prevalência da infecção por *Toxoplasma gondii* em suínos abatidos no Estado do Paraná, Brasil. Ciências Agrárias, Londrina, 26:563-568.

CLEMENTINO- ANDRADE, M.M.; PINHEIRO , B.V.; CUNHA , M.M.; CARNEIRO, A.C.A.V.; ANDRADE NETO, V.F.; VITOR, R.W.A. 2013. New genotypes of *Toxoplasma gondii* obtained from farm animals in Northeast Brazil. Research in Veterinary Science, 94:587–589.

COOK AJ, GILBERT RE, BUFFOLANO W 2000. Sources of *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women: European multicentre case-control study. Brazil Medical Journal, 15:142–147.

DARDÉ ML, BOUTEILLE B, PESTRE-ALEXANDRE M 1992. Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. Journal Parasitology, 78: 786–794.

DARDÉ ML 2004. Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*. Ann Istitute Super Sanità 40: 57-63.

DA SILVA, A.V.; BOARETO, H.; ISBRECHT, F.B.; DA SILVA, R.C.; LANGONI, H. 2008. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos da região oeste do Paraná, Brasil. Veterinária e Zootecnia,15:263–266.

DA SILVA RC, SU C, LANGONI H. First identification of clonal type II isolates of *Toxoplasma gondii* from Brazil. Proceedings of the 10th International Congress on Toxoplasmosis; 2009 June 19-23; Kerkrade, The Netherlands. Intervet Shering Plough; 2009. p.152

DOS SANTOS, C.B.A.; DE CARVALHO, A.C.F.B.; RAGOZO, A.M.A.; SOARES, R.M.; AMAKU, M.; YAI, L.E.O.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M. 2005. First isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from finishing pigs from São Paulo State, Brazil. Veterinary Parasitology.131: 207–211.

DU, F.; ZHANG, Q.; YU, Q.; HU, M.; ZHOU, Y.; ZHAO, J. 2012. Soil contamination of *Toxoplasma gondii* oocysts in pig farms in central China. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, 187:53–56.

DUBEY, J. P. 1991. National seroprevalence of *T. gondii* in pigs. *Journal of Parasitology*, Lawrence, 77:517-521.

DUBEY, J.P.; WEIGEL, R.M.; SIEGEL, A.M.; THULLIEZ, P.; KITRON, U.D.; MITCHELL, M.A.; MANNELLI, A.; MATEUS-PINILLA, N.E.; SHEN, S.K.; KWOK, O.C. 1995. Sources and reservoirs of *Toxoplasma gondii* infection on 47 swine farms in Illinois. *Journal Parasitology*, 81:723-729.

DUBEY, J.P. 1998. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. *Veterinary Parasitology*, 74:75-77.

DUBEY, J.P.; GAMBLE HR, HILL D, SREEKUMAR C, ROMAND S, THULLIEZ P 2002. High prevalence of viable *Toxoplasma gondii* infection in market weight pigs from a farm in Massachusetts. *Journal Parasitology* 88:1234-1238.

DUBEY, J.P.; LEVY, M.Z.; SREEKUMAR, C.; KWOK, O.C.H.; SHEN, S.K.; DAHL, E.; THULLIEZ, P.; LEHMAN, T. 2004. Tissue distribution and molecular characterization of chicken isolates of *Toxoplasma gondii* from Peru. *Journal Parasitology*, 90: 1015-1018.

DUBEY, J.P.; SUNDAR, N.; GENNARI, S.M.; MINERVINO, A.H.; FARIAS, N.A.; RUAS, J.L. 2007. Biologic and genetic comparison of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from the northern Para state and the southern state Rio Grande do Sul, Brazil revealed highly diverse and distinct parasite populations. *Veterinary Parasitology* 143(2): 182-188.

DUBEY, J.P.; VELMURUGAN, G.V.; CHOCKALINGAM, A.; PENA, H.F.J.; OLIVEIRA, L.N.; LEIFER, C.A.; GENNARI, S.M.; BAHIA OLIVEIRA, L.M.G.; SU, C. 2008. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Brazil. *Veterinary Parasitology*, 157: 299–305.

DUBEY JP, SU C. 2009. Population biology of *Toxoplasma gondii*: what's out and where did they come from. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(2): 190-195

DUBEY, JP. *Toxoplasmosis of animals and humans*. Second edition. CRC Press; Boca Raton, FL.: p. 1-313, 2009a.

DUBEY, J. P. *Toxoplasmosis in pigs—The last 20 years*. *Veterinary Parasitology* v. 164, p.89–103, 2009b.

DUBEY, J.P., RAJENDRAN, C., COSTA, D.G., FERREIRA, L.R., KWOK, O.C.H., QU, D., SU, C., MARVULO, M.F., ALVES, L.C., MOTA, R.A., SILVA, J.C., 2010. New *Toxoplasma gondii* genotypes isolated from free-range chickens from the Fernando de Noronha, Brazil: unexpected findings. *Journal of Parasitology* 96, 709–712.

DUBEY, J.P.; HILL, D.E.; ROZEBOOM, D.W.; RAJENDRANA, C.; CHOUDHARY, S.; FERREIRA, L.R.; KWOK, O.C.H.; C. SU. 2012. High prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from organic pigs in northern USA. *Veterinary Parasitology*, 188:14-18.

FARREL, R. L.; DOCTON, F.L.; CHAMBERLAIN, D.M.; COLE, C.R. 1952. *Toxoplasma* isolated from swine. *American Journal of Veterinary Research*, 5:(3)181-185.

FEITOSA TF, VILELA VL, DE MELO LR, DE ALMEIDA NETO JL, SOUTO DV, DE MORAIS DF, ATHAYDE AC, AZEVEDO SS, PENA HF. 2014. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in slaughtered pigs from Northeast, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 28:202(3-4):305-9.

FERNANDES, E.F.T., SIMÕES, S.G., FARIA, E.B., SAMICO FERNANDES, M.F.T., PINHEIRO JÚNIOR, J.W. , MOTA, R.A. 2011. Anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* e suínos abatidos em matadouros da região metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico*, 78:(3)425-428.

FERREIRA AM, VITOR RWA, GAZZINELLI RT, MELO MN 2006. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR–RFLP. *Infect Genetic Evolution* 6: 22-31.

FIALHO C. G.; ARAÚJO F. A. P. 2002. Comparação entre os testes de imunofluorescência indireta e hemaglutinação indireta para detecção de anticorpos anti- *Toxoplasma gondii* em soros de suínos. *Acta Scientiarum Veterinary*, 30(3): 185-189.

FIALHO C. G.; ARAÚJO F. A. P. 2003. Detecção de anticorpos para *Toxoplasma gondii* em soro de suínos criados e abatidos em frigoríficos da região da grande Porto Alegre- RS, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, 33:(5)893- 897.

FRAZÃO-TEIXEIRA, E.; OLIVEIRA, F. C. R.; ALMEIDA, E. S. C. TEIXEIRA, W. L. 2002. Sensibilidade Comparativa do Gerbil (*Meriones unguiculatus*) e do camundongo (*Mus musculus*) inoculados com Oocistos Esporulados de *Toxoplasma gondii* (NICOLLE ; MANCEAUX, 1909) DA CEPA VEG. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 11:(2)65-69.

FRAZÃO-TEIXEIRA, E. ; SUNDAR, N.; DUBEY, J.P.; GRIGG, M.E.; DE OLIVEIRA, F.C.R. 2011. Multilocus DNA sequencing of *Toxoplasma gondii* isolated from Brazilian pigs identifies genetically divergent strains. *Veterinary Parasitology* 175: 33-39.

GOULART, P.R.M.; BEATRIZ BRENER, B.; AMENDOEIRA, M.R.R. 2013. Mamíferos de produção e seu papel na cadeia epidemiológica do *Toxoplasma gondii*- revisão. Vet.Not, 19:(2) 109-126.

HILL, D.; DUBEY, J. P. 2002. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. Clinical Microbiology Infect, 8:634-640.

HILL, D.E.; SREEKUMAR, C.; GAMBLE, H.R.; DUBEY, J.P. 2004. Effect of commonly used enhancement solutions on the viability of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork loin. Journal of Food Protection; 67: 2230-2233.

HILL, D. E. ; CHIRUKANDOTH, S.; DUBEY, J.P.; LUNNEY, J.K.; GAMBLE, H.R..2005. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. Animal Health Research Reviews, 6:41-61.

HILL, D.E.; CHIRUKANDOTH, S.; DUBEY, J.P.; LUNNEY, J.K.; GAMBLE, H.R. 2006. Comparison of detection methods for *Toxoplasma gondii* in naturally and experimentally infected swine. Veterinary Parasitology, 141: (1-2)9–17.

HILL, D.E.; CATHLEEN, C.; DUBEY, J.P.; WROBLEWSKI K.; SAUTTER. M.; HOSTEN, T.; MUÑOZ-ZANZI, M.U.I.; WITHERS, S. E.; BOYER, K.; HERMES, G.; COYNE, J.; JAGDIS, F.; BURNETT, A.; PATRICK, M.; MORTON, H.; ROBINSON, D.; MCLEOD, R. 2011. Identification of a sporozoite-specific antigen from *Toxoplasma gondii*. Journal Parasitology, 97: 328-337.

HOWE, D.K.; SIBLEY, L.D. 1995. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: Correlation of parasite genotype with human disease. The Journal of Infectious Disease, 172:1561–1566.

HOWE DK, HONORE S, DEROUIN F, SIBLEY LD 1997. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. Journal Clinical Microbiology 35: 1411–1414.

HUGH-JONES, M. E.; BROUSSARD, J.J.; STEWART, T.B.; RABY, C.; MORRISON, J.E. 1986. Prevalence of *T. gondii* antibodies in Southern Louisiana swine in 1980 and 1981. American Journal of Veterinary Research, 47:1050-1051.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2013. Banco de dados agregados Sistema IBGE de recuperação automática. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2011/>. Acesso em: 20 dez. 2014.

JACOBS, L., REMINGTON, J. S.; MELTON, M. L. 1960. The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. Journal Parasitology, 46:11–21.

JONES, J.L, DUBEY, J.P. 2010. Waterborne toxoplasmosis—recent developments. Experimental Parasitology; 124:10–25

KAWAZOE, U. *Toxoplasma gondii* In: NEVES, D. P. Parasitologia Humana. 10. Ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2000. p. 147-156.

KIJLSTRA, A.; MEERBURG, B.; CORNELISSEN, J.; DE CRAEYE, S.; VEREIJKEN, P.; JONGERT, E. 2008. The role of rodents and shrews in the transmission of *Toxoplasma gondii* to pigs. *Veterinary Parasitology*, 156:(3-4)183-190.

KOMPALIC-CRISTO, A.; BRITTO C.; FERNANDES O. 2005. Diagnóstico molecular da toxoplasmose: revisão. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, Rio de Janeiro, 41: (4) 229-235.

LANGONI, H.; MODOLO, J. R.; PEZERICCO, S. B.; SILVA, R. C.; CASTRO, A. P. B.; DA SILVA, A. V., PADOVANI, C. R. 2008. Serological profile of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in apparently healthy dogs of the city of Botucatu, São Paulo State, Brazil. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 12:(1)142-148.

LAPPIN, M. R. 1994. Feline Zoonotic Diseases. In: *The Veterinary Clinics Of North América: Small Animal Practice*, 23:(1)55-77.

LARSSON, C. D. 1989. Diagnóstico laboratorial da toxoplasmose – reações utilizadas e representação clínica. *Cães e Gatos*, 5-11.

LAUAR, N. M. Toxoplasmose. In: GONÇALVES, C. A. et al. **Zoonoses**. Campinas: CATI, 1995. p: 107-113. (Manual, 31).

LEHMANN T, BLACKSTON CR, PARMLEY SF, REMINGTON JS, DUBEY JP 2003. Strain typing of *Toxoplasma gondii*: comparison of antigen-coding and housekeeping genes. *Journal Parasitology*, 86: 960-971.

LEHMANN, T., MARCET, P. L., GRAHAM, D. H., DAHL, E. R. ; DUBEY, J. P. 2006. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. *Academic Science*, 103:11423–11428.

LEVINE, N.D. 1988. Progress in taxonomy of the Apicomplexan protozoa. *Journal Protozoology*, 35:518–520.

LIMA, E. S. Diagnóstico sorológico de Doenças Infeciosas causadoras de falhas reprodutivas em suínos. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) Universidade do Estado de Santa Catarina, Departamento de Ciências Agroveterinárias, Lages, 2010.

LUFTZ, B. J.; BROOKS, R.G., CONLEY, F.K., MCCABE, R.E., REMINGTON, J.S. 1984. Toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immune deficiency syndrome. *Journal of American Medicine Association*, 252:913-917.

LUZON M., ALONSO A.; GOZALO A.Q. 1997. Etiologia y biología: Toxoplasmosis. *Revta Ovis, Tratado de Patologia y Produccion Ovina*, 52:11-17.

- LYNFIELD R., GUERINA N. G. 1997. Toxoplasmosis. *Pediatrics Review*; 18(3):75-83.
- MACEDO, M.F.S.B.; MACEDO, C.A.B., EWALD, M.P.C.; MARTINS, G.F.; ZULPO, D.L.; CUNHA, I.A.L. 2012. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from pregnant dairy cows (*Bos taurus*) slaughtered. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 7: 197-206.
- MATEUS-PINILLA, N. E., DUBEY, J. P., CHOROMANSKI, L. ; WEIGEL, R. M. 1999. A field trial of the effectiveness of of a feline *Toxoplasma gondii* vaccine in reducing *T. gondii* exposure for swine. *Journal of Parasitology*, 85:855–860.
- MARTINS, C. S.; VIANA, J. A. 1998. Toxoplasmose - o que todo profissional da saúde deve saber - Revisão. *Clínica Veterinária*, 15: 33-37.
- MEIRELES, L. R. Estudo das fontes de infecção da toxoplasmose humana em diferentes localidades do Estado de São Paulo. 2001. 141 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. São Paulo-SP.
- MELAMED J. 1992. Epidemiology of ocular toxoplasmosis in Rio Grande do Sul, Brazil. In: Dernouchamps JP, Verougstraete L, Caspers- Velu L, Tassingnon MJ, eds. Recent advances in uveites. Brussels: Proceedings of the Third International Symposium on Uveitis, 211–214.
- MILLAR, P. R.; DAGUER, H.; VICENTE, R. T.; COSTA, T.; SOBREIRO, L. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. 2008. *Toxoplasma gondii*: estudo soro-epidemiológico de suínos da região Sudoeste do Estado do Paraná. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 28: (1).
- MOURA, A. B.; OSAKI, S. C.; ZULPO, D.L.; MARANA, E.R.M. 2007. Ocorrência de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em suínos e ovinos abatidos no município de Guarapuava, PR, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 16:(1)54-56.
- MORAES E.P.B.X., BATISTA A.M., FARIA E.B., FREIRE R.L., FREITAS A.C., SILVA M.A.R., BRAGA V.A.; MOTA R.A. 2010. Experimental infection by *Toxoplasma gondii* using contaminated semen containing different doses of tachyzoites in sheep. *Vet. Parasitol.* 170:318-322.
- NEVES, D. P. *Parasitologia humana*. 10a. Ed. São Paulo, Atheneu, 2000, p. 428.
- NICOLLE C., MANCEAUX L. 1908. Sur une infection a corps de Leishman (ou organismes voisins) *T. gonii*, *Academic Science* 147: 736.
- NORSWORTHY, G. D. Toxoplasmosis. In: NORSWORTHY, G.D. et al. *The Feline Patient*, Williams; Wilkins, p. 432-434, 1998.
- OLIVEIRA, K. R.; DOMINGUES, P.F.; LANGONI, H.; SILVA, R.C.; GOTTSCHALK, S. 2007. Detecção de anticorpos para *Toxoplasma gondii* em soros de suínos criados sob

condições rústicas na microrregião de Registro – SP pelo método de aglutinação direta (MAD). Veterinária e Zootecnia, 14: (2)169-175.

PENG, H.J.; CHEN, X.G.; LINDSAY, D.S. 2011. A review: competence, compromise, and concomitance: reaction of the host cell to *Toxoplasma gondii* infection and development. *J Parasitol* 97: 620–628.

PERDONCINI, G.; PASQUALI, A.K.S.; MARIANI, F.; CEMBRANEL, D.G.; ESCOPELLI, K.S. 2010. Prevalência de *Toxoplasma gondii* em aves e suínos: um problema para a saúde pública. Unoesc; Ciência – ACBS, Joaçaba, 1:(1)57-64.

PEREIRA I. C. Soroprevalência de anticorpo para *Toxoplasma gondii* em suínos e características epidemiológicas de estabelecimentos de criação industrial e artesanal da região de Pelotas-RS. Tese - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2005.

PEZERICO, G.B.; PEZERICO, S.B.; SILVA, R.C.; HOFFMANN, J.L.; CAMARGO, L.B.; H. LANGONI, H. 2007. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Leptospira* spp. em suínos abatidos em três abatedouros dos Estados de Minas Gerais e São Paulo. Arquivos Instituto Biológico São Paulo, 74:(3)267-270.

PIASSA, F.R.; ARAÚJO, J.B.; ROSA, R.C. ;MATTEI, R.J.; SILVA, R.C.; LANGONI, H.; DA SILVA, A. V. 2010. Prevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in certified and non-certified pig breeding farms in the Toledo microregion, PR, Brazil. Revista Brasileira Parasitologia Veterinária, Jaboticabal, 19:152-156.

PRICKETT, M. D.; DREESEN, D.W.; WALTMAN, W.D.; BLUE, J.L.; BROWN, J. 1985. Correlation of tissue infection and findings in pigs fed *Toxoplasma gondii* oocysts. American Journal of Veterinary Research, 46: (5)1130-1132.

QUINN, P. J. 2005. Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas. São Paulo: ArtMed, 179-183.

RAGOZO, A.M.A.; PENA, H.F.J.; YAI, L.E.O.; SU. C.; GENNARI, S.M. 2010. Genetic diversity among *Toxoplasma gondii* isolates of small ruminants from Brazil: Novel genotypes revealed. Veterinary Parasitology, 170:307-312.

RICHOMME, C., D. AUBERT, E. GILOT-FROMONT, D. AJZENBERG, MERCIER, C. DUCROT, H. FERTÉ, D. DELORME, and I. VILLENA. 2009. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from wild boar (*Sus scrofa*) in France. Veterinary Parasitology, 164:296–300.

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M.L. 2012. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. Clinical Microbiology 25:264–296.

ROSA, L. C.; KASAIL, N.; SOUZA, S.L.P.; GUERRA, J.L.; REGO, A.A; GENNARI, S.M. 2001. Comparação das técnicas de imuno-histoquímica e bioensaio em camundongos para

pesquisa de *Toxoplasma gondii* em tecidos de caprinos, experimentalmente inoculados. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, 68: (1)13-17.

SAMICO FERNANDES, E. F. T., SAMICO FERNANDES, M. F. T., KIM, P. C. P., DE ALBUQUERQUE, P. P. F., SOUZA NETO, O. L., SANTOS, A. S., MORAES, E. P. B. X., MORAIS, E. G. F., MOTA, R. A. 2012. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in slaughtered pigs in the state of Pernambuco, Brazil. J. Parasitology, 98: (3) 690–691.

SANTOS, C. B. A.; CARVALHO, A.C.F.B.; RAGOZO, A.M.A.; SOARES, R.M.; AMAKU, M.; YAI, L.E.O.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M. 2005. First isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from finishing pigs from São Paulo State, Brazil. Veterinary Parasitology, 131: (3-4) 207-211.

SARAZÁ, M. L.; S ÁNCHEZ-VAZCAÍNO, J. M. 2002. Mecanismo de infección de las enfermedades animales. Porcine, 68: 13-26.

SAWADOGO P.; HAFID, J.; BELLETE, B.; SUNG, R.T.M.; CHAKDI, M.; FLORI, P.; RABERIN, H.; HAMOUNI, I.B.; CHAIT, A.; DALAL, A.2005. Seroprevalence of *T. gondii* in sheep from Marrakech, Morocco. Veterinary Parasitology, 130:89-92.

SCHENK, M.A.M.; LIMA J.D.; VIANA, F.C. 1976. Frequência da toxoplasmose em suínos abatidos em Belo Horizonte, Minas Gerais. Arquivos da Escola Superior de Veterinária da Universidade Rural de Minas Gerais, 28: (3)261-266.

SHERDING, R. G. 1998. Toxoplasmose, Neosporose e Outras Infecções Protozoárias Multissistêmicas. In: BIRCHARD, S.J.; SHERDING, R.G. (eds). Manual Saúde Clínica de Pequenos animais, 157- 162.

SIBLEY, L.D.; AJIOKA, J.W. 2008. Population structure of *Toxoplasma gondii*: clonal expansion driven by infrequent recombination and selective sweeps, Anuário Revista Microbiologia . 62:329-51.

SIBLEY, L.D.; KHAN, A.; AJIOKA, J.W.; ROSENTHAL, B.M. 2009. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. Philos Trans Research Society 364: 2749–2761

SILVA, J. M. L. 1959. Sobre um caso de toxoplasmose espontânea em suínos. Arquivos da Escola Superior de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, 12: (1) 425-428.

SILVA A. V.; BOARETO, H.; ISBRECHT, F.B. 2008. Ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos da região oeste do Paraná, Brasil. Veterinária e Zootecnia, 15:263-266.

SILVA, RODRIGO COSTA DA SILVA, R. C.; ZAMPROGNA, T. O. ; LUCAS, T.M. 2010 *Toxoplasma gondii* em suínos com ênfase na contribuição brasileira. Scientia Medica, 20: (1)120-130.

SILVA, R.C.; LANGONI, H.; SU, C.; SILVA, A.V. 2011. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* in sheep from Brazilian slaughterhouses: new atypical genotypes and the clonal type II strain identified. *Veterinary Parasitology* 175: 173-177.

SU, C., ZHANG, X.; J. P. DUBEY. 2006. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites. *International Journal Parasitology*, 36: 841–848.

SU, C.; SHWAB, E.K.; ZHOU, P.; ZHU, X.Q.; DUBEY, J.P. 2010. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. *Veterinary Parasitology* 137: 1-11.

SUARÉZ-ARANDA, F.; GALISTEO, A.J.; HIRAMOTO, R.M.; CARDOSO, R.P.; MEIRELES, L.R.; MIGUEL, O.; ANDRADE, H.F.JR. 2000. The prevalence and avidity of *Toxoplasma gondii* IgG antibodies in pigs from Brazil and Peru. *Veterinary Parasitology*, 91: (1-2) 23-32.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal For Parasitology*, 30: 1217-1258.

TREVISANI, N.; VIEIRA-NETO, A.; GÜTHS, M.F.; SARTOR, A.A., DE SOUZA, A.P.; DE MOURA, A.B. 2013. *Toxoplasma gondii*: sorologia e fatores de risco em suínos de granjas no Vale do Itajaí, Santa Catarina. *Archives of Veterinary Science*, 18: 14-19.

TSUTSUI V. S.; NAVARRO, I.T.; FREIRE, R.L.; FREITAS, J.C.; PRUDÊNCIO, A.C.B.; DELBEM, MARANA, E.R.M. 2003. Soroepidemiologia e fatores associados à transmissão do *Toxoplasma gondii* em suínos no norte do Paraná. *Archives Veterinary Science, Curitiba*, 8: (2)27-34.

UGGLA, A. 1986. *Toxoplasma gondii* in farm animals: some immunodiagnostic methods and their potential use. Uppsala: Merkantil-Tryckeriet, 1-56.

URQUHART, G. M. *Parasitologia veterinária*. 2.ed. Rio de Janeiro : Guanabara, 1998. p. 273.

VALENÇA, R. M. B.; MOTA, R. A.; ANDERLINI, G. A.; FARIA, E. B.; CAVALCANTI, E. F. S. T. F.; ALBUQUERQUE, P. P. F.; NETO, O. L. S.; GUERRA, M. M. P. 2011. Prevalência e fatores de risco associados à infecção por *Toxoplasma gondii* em granjas suinícolas tecnificadas no Estado de Alagoas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 31: (2)121-126.

VELMURUGAN, G.V.; SU, C.; DUBEY, J.P. 2009. Isolate designation and characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs in the United States. *Journal Parasitology*, 94: 95-99.

VIDOTTO, O.; NAVARRO, I.T., GIRALDI, N., MITSUKA, R.; FREIRE, R.L. 1990. Estudos Epidemiológicos da Toxoplasmose em suínos da região de Londrina-PR. *Seminário*, 11: (1)53-59.

WEIGEL, R.M., DUBEY, J.P., SIEGEL, A.M. 1995. Risk factors for transmission of *Toxoplasma gondii* on swine farms in Illinois. *Journal Parasitology*, 81: (5)736-741.

WEINMAN, D.; CHANDLER, A. H. 1954. Toxoplasmosis in swine and rodents. Reciprocal oral infection and potential human hazard. *Society Experimental Biology Medical*, 87:211–216.

ZHU, J.; YIN, J.; XIAO, Y.; JIANG, N.; ANKARLEV, J.; LINDH, J.; CHEN, Q. 2008. A seroepidemiological survey of *Toxoplasma gondii* infection in free-range and caged chickens in northeast China. *Veterinary Parasitology* 158: 360–363.

ZHOU, P.; ZHANG, H.; LIN, R.Q.; ZHANG, D.L. 2009. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from China. *Parasitology Institute* 58: 193-195.

4. ARTIGOS

4.1 ARTIGO

Ocorrência de *Toxoplasma gondii* em suínos de criações de subsistência: soroprevalência e bioensaio

(Formatado para o periódico The Journal of Parasitology)

RUNNING HEAD: FERNANDES ET AL. – Ocorrência de *Toxoplasma gondii* em suínos

Ocorrência de *Toxoplasma gondii* em suínos de criações de subsistência: soroprevalência e bioensaio

RESUMO: O objetivo desse estudo foi estudar a ocorrência de *Toxoplasma gondii* em suínos de criações de subsistência no estado de Pernambuco, região nordeste do Brasil. Foram analisadas 224 amostras de sangue e tecidos de suínos abatidos em matadouros municipais. Inicialmente avaliou-se a presença de anticorpos anti- *T. gondii* pela técnica da reação de Imunofluorescência indireta (RIFI). Os animais soropositivos tiveram seus tecidos analisados nas técnicas de bioensaio em camundongos, histopatologia, imunohistoquímica (IHQ) e reação em cadeia da polimerase (PCR). Dos animais amostrados, 38,0% (85/224) foram positivos na RIFI com títulos variando de 64 a 1024. Na histopatologia não foram observadas lesões associadas à toxoplasmose nos tecidos avaliados e na IHQ também não foram obtidas imunomarcações positivas. A PCR dos tecidos de suínos revelou 14,1% (12/85) amostras positivas e no bioensaio em camundongos, 28,0% (5/18) das amostras foram positivas. Os resultados obtidos neste estudo são um indicativo da condição sanitária do rebanho e do risco de infecção por *Toxoplasma gondii* em suínos de criações de subsistência e para a população humana na região estudada. É importante a implementação de medidas preventivas para minimizar os efeitos negativos da infecção por este protozoário em suínos nesta região do Brasil.

ABSTRACT: The aim of this study was to study the occurrence of *T. gondii* in pigs subsistence creations in the state of Pernambuco, northeastern Brazil. It was analyzed 224 blood samples and tissues from pigs slaughtered in municipal slaughterhouses. Initially it was evaluated the presence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies by the technique of Indirect Immunofluorescence Assay (IFA). The positive animals had their tissues analyzed by bioassay techniques in mice, histopathology, Immunohistochemistry (IHC) and Polymerase Chain Reaction (PCR). Of animals sampled, 38.0% (85/224) were positive in the IFA with titles ranging from 64 to 1024. In the histopathology were not observed associated injuries to toxoplasmosis in the evaluated tissues and in the IHC were not obtained positive immunostaining. The PCR of pig tissues showed 14.1% (12/85) of positive samples and in the mouse bioassay, 28.0% (5/18) of the samples were positive. The results of this study are indicative of the sanitary condition of the flock and the risk of *Toxoplasma gondii* infection in

swine subsistence creations and for the people of the region studied. It is important to implement preventive measures to avoid or minimize infections in pigs in this region of Brazil.

Introdução

Toxoplasma gondii, protozoário cosmopolita, intracelular obrigatório, é agente de uma das infecções parasitárias mais comuns do homem, dos animais domésticos e selvagens (DUBEY, 2010). As principais formas de infecção ocorrem por via oral, através da ingestão de carne mal cozida contendo cistos, de alimentos e água contaminados com oocistos eliminados nas fezes de gatos infectados, ou ainda pela via transplacentária (DUBEY; JONES 2008).

Os suínos são hospedeiros intermediários com grande importância para a manutenção de *T. gondii* na natureza, seus produtos e subprodutos são uma importante fonte de infecção para o homem (OLIVEIRA et al., 2014). A maioria dos suínos se infecta com o protozoário após o nascimento, por ingestão de oocistos no ambiente contaminado ou ingestão de tecidos de animais infectados (KIJLSTRA et al. 2008). Nas criações artesanais, a possível ingestão de roedores, pássaros, vísceras de animais de abate doméstico e alimentos ou água contaminados, aumenta o risco de infecção (DUBEY, 2009).

A ingestão de produtos de origem animal crus e/ou mal cozidos contendo cisto vêm sendo apontada como uma das principais fontes de infecção deste protozoário para o homem (DUBEY, 2009). Os suínos são considerados uma importante fonte de infecção de *T. gondii* para os humanos em alguns países (TENTER, 2000; DUBEY, 2010). Recentemente, Dubey (2009, 2010) relatou a prevalência mundial da infecção pelo *T. gondii* em suínos, inclusive no Brasil, onde esse percentual variou de 1,32% a 90,4%, demonstrando a importância e distribuição desta enfermidade no território brasileiro.

Contudo, na região nordeste do Brasil, ainda são escassos os trabalhos com a espécie suína e desta forma objetivou-se neste trabalho realizar um estudo sobre a ocorrência de *T. gondii* em suínos destinados ao consumo humano no estado de Pernambuco, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Aspectos éticos

O estudo foi realizado após prévia aprovação pelo comitê de ética no uso de animais-CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil (processo n. 015533/2012-71), Controle CEUA D08.

Local de Estudo

A região escolhida para a realização da pesquisa foi o Agreste Pernambucano que se caracteriza por apresentar uma economia diversificada. Esta Mesorregião possui uma área de aproximadamente 24.400 Km² dividida em seis microrregiões: Vale do Ipanema, Vale do Ipojuca, Alto Capibaribe, Médio Capibaribe, Garanhuns e Brejo Pernambucano. Setenta e um municípios no total compõem o Agreste Pernambucano, totalizando uma população de 2.217.212 habitantes (IBGE, 2011). Na Figura 1 está destacada que a mesorregião do Agreste está localizada entre o Sertão Pernambucano e a Mata Pernambucana. A economia agrícola desta região baseia-se na agricultura familiar, sendo as principais atividades agropecuárias, a criação de gado, ovelhas e suínos. O Agreste pernambucano, no sentido leste-oeste, inicia-se onde há diminuição da pluviosidade devido à topografia que limita a passagem da umidade litorânea e termina em uma faixa mais seca, onde o clima semi-árido apresenta-se mais acentuado e a vegetação apresenta maior tolerância à seca (LIMA et al., 2007)

Composta por 16 municípios, a microrregião do Vale do Ipojuca (área do estudo) possui estrutura urbana mais consolidada, com razoável dinamismo no setor industrial e comercial. Os municípios com maior número de habitantes e com o maior consumo de carne suína são Caruaru, Gravatá e Brejo da Madre de Deus, motivo pelos quais foram escolhidos para compor a amostra desse estudo.

utilizados taquizoítos da cepa RH, além de controles positivos e negativos em todas as reações.

Bioensaio

Para o bioensaio utilizaram-se as amostras de suínos positivos na sorologia. A digestão péptica das amostras de tecidos dos suínos foi realizada de acordo com o protocolo de Dubey (1998). Para cada amostra de tecido foi pesado 50g do material homogeneizado e, em seguida, triturado com auxílio de um mixer. Adicionou-se 250 mL de solução salina e 250 mL de solução ácida de pepsina (pH 1,1-1,2). O material foi incubado em banho-maria com agitação a uma temperatura de 37°C durante 1 hora. Após esse tempo o material foi filtrado e centrifugado em 1200g durante 10 min. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi ressuspensão com solução de bicarbonato de sódio a 1,2% (pH 8,3) e centrifugado a 1200g por 20 min. O sobrenadante foi novamente desprezado e o sedimento ressuspensão em 5 mL de uma solução de antibiótico contendo 1.000 UI penicilina e 100 µg de estreptomicina por mL de PBS. Este produto foi inoculado via subcutânea em camundongos Swiss Webster (25-35g), na dose de 1 mL por animal. Os camundongos foram observados diariamente durante 60 dias e eutanasiados no final deste período para recuperação dos órgãos e sangue para realizar a PCR do *pool* de órgãos e a RIFI.

Extração do DNA dos tecidos

Foi realizada a extração de DNA das amostras de tecidos (cérebro, coração, fígado e pulmão) dos suínos soropositivos na RIFI e dos tecidos dos camundongos submetidos ao bioensaio com o kit comercial “Qiagen DNA Easy Blood and Tissues Kit” (Qiagen®), utilizando-se o protocolo do fabricante. O DNA extraído foi analisado e quantificado em gel de agarose a 0,8%, com marcador de peso molecular 1Kb, corado com blue green, visualizado em luz ultravioleta e fotografado para verificação de sua qualidade.

PCR

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 12,5µL contendo: 2,5µL de DNA genômico, 0,5µM de cada iniciador, 2,75µL de Água Mili-Q ultrapura e 6,25µL de MasterMix (mistura para PCR - Qiagen) de acordo com o protocolo do fabricante. O perfil térmico das etapas das reações foi feita em termociclador MJ-96G (Biocycle Co. Ltd, Hangzhou - China) e seguido de acordo com o protocolo descrito em Homan et al. (2000). Os pares de iniciadores utilizados são fragmentos da sequência do gene *BI*. Para a primeira amplificação foram utilizados TOX-4 (CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG) TOX-5 (CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT), amplificando uma região com 529 pares de base (pb) (HOMAN et al., 2000). Os produtos amplificados foram detectados por eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com *blue green* e visualizados através de luz ultravioleta e fotodocumentados. Medidas para evitar contaminação entre amostras foram seguidas conforme recomendações de Kwok (1990) desde a colheita das amostras até a obtenção dos resultados. O controle positivo da reação foi uma suspensão de taquizoítos da cepa RH na concentração 10⁴ taquizoítos/mL para extração do DNA parasitário e o negativo foi utilizado água ultrapura. Para confirmação da identidade dos fragmentos amplificados foi utilizado o sequenciamento de DNA. Os fragmentos de DNA analisados apresentaram valores de similaridade e identidade com as sequências do *T. gondii* já existentes no GenBank que variaram de 93 a 99%.

Histopatologia e imunohistoquímica dos tecidos de suínos e camundongos

Fragmentos de tecidos dos suínos positivos na RIFI e dos camundongos do bioensaio (cérebro, coração, pulmão) foram fixados em formol tamponado a 10% e processados pelos métodos usuais para análise histológica. Após a fixação foi realizada a desidratação dos fragmentos em banhos de álcool absoluto, seguido de diafanização em xilol, banho de parafina a 60°C e por último, os fragmentos foram incluídos em parafina. Depois foram cortadas a 5µm e coradas pela hematoxilina-eosina (HE) (LUNA, 1968).

Para a imunohistoquímica, os tecidos foram cortados em micrótomo (5µm) e aderidos a lâminas de vidro previamente tratadas com solução de silano (3-aminopropyl-triethoxysilane, Sigma-Aldrich, cat. A3648) em acetona a 2% (para proporcionar adesão adequada dos fragmentos). Em seguida foram desparafinadas em xilol, lavadas em álcool e

hidratadas em água destilada. Foi realizada a reativação antigênica com a utilização de tampão citrato por 15 minutos em micro-ondas em alta potência. Novamente, realizou-se a lavagem com água destilada e em seguida as lâminas foram tratadas com leite em pó desnatado (Molico) a 5% em solução aquosa, por 30 minutos, para minimizar as reações inespecíficas do anticorpo e lavadas em água destilada. Depois, os fragmentos foram incubados “overnight” a 6°C (em geladeira) com anticorpo primário contra *Toxoplasma gondii* policlonal (ABCAM) numa diluição de 1:200 em PBS (“phosphate buffer saline”). No dia seguinte, após a lavagem das lâminas em água destilada, utilizou-se a técnica do complexo avidina-biotina fosfatase alcalina com o kit comercial LSAB (Labeled Streptavidin Biotin, Dako, cat. 0689) e a revelação das reações foi realizada com o cromógeno Permanent Red (Dako, cat. K0640) de acordo com as instruções do fabricante. As lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Harris (LUNA, 1968) e em seguida montadas com lamínula. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico (Olympus CX40). A cada processamento foi utilizado um controle positivo e negativo.

Análise estatística

Para o estudo epidemiológico da população estudada foi aplicado um questionário anotando-se informações como sexo, idade, tipo de alimentação, sistema de criação e presença de gatos nas criações para identificar possíveis fatores de risco.

Os dados foram tabulados e analisados estatisticamente por meio da distribuição das frequências relativa e absoluta. Além disso, realizou-se uma análise univariada por meio do teste Qui-quadrado tendo como variável dependente o resultado obtido na sorologia e PCR. O nível de significância adotado foi de 5% (THRUSFIELD, 2004). O programa SPSS for Windows, versão 19,0 – *Statistical Package for the Social Science* foi utilizado para a execução dos cálculos estatísticos.

Para o estudo de concordância entre os testes de diagnóstico (sorologia e PCR) utilizou-se o coeficiente Kappa (K) e a interpretação dos valores K adotadas foram: 0,00 - 0,20 =concordância fraca, 0,21 - 0,40 = regular, 0,41 - 0,60 = moderada, 0,61 - 0,80 = boa, 0,81-1,00 = muito boa e valores negativos foram interpretados como equivalentes a 0,00 (LANDIS E KOCH, 1977).

RESULTADOS

Dos suínos analisados, 38,0% (85/224) apresentaram anticorpos contra- *T. gondii*. Os suínos adultos com mais de um ano de idade apresentaram frequência de 39,4% (54/137) e os jovens (≤ 6 meses), de 35,6% (31/87).

Entre os machos, 36,6% (34/93) foram positivos contra 39,0% (51/131) para fêmeas. Das amostras positivas na sorologia, 37,6% (32/85) apresentaram título de 64; 28,2% (24/85) apresentaram títulos de 128; 21,1% (18/85), títulos de 256, 5,8% (10/85) títulos de 512 e 1,8% (1/85) título de 1024.

Não foram encontrados cistos e imunomarcações positivas nas técnicas de histopatologia e imunohistoquímica, respectivamente.

A PCR dos tecidos dos suínos revelou 14,1% (12/85) amostras positivas, sendo quatro de fragmentos de coração e oito de tecido cerebral. Na PCR dos tecidos de camundongos utilizados no biensaio, 28,0% (5/18) também apresentaram DNA de *T. gondii* (Tabela 1).

Tabela 1 - Isolamento de *Toxoplasma gondii* em suínos de criações de subsistência no estado de Pernambuco, Brasil.

Camundongos	Bioensaios	Sinais Clínicos	PCR dos Órgãos de Camundongos (DNA <i>T. gondii</i>)				
			cérebro	coração	fígado	lavado peritoneal	pulmão
1	2	S	+	-	-	-	-
2	2	S	+	-	-	-	-
3	5	N	+	-	-	-	-
4	6	S	-	+	-	-	-
5	15	N	-	+	-	-	-
Total	18	3	3	2	0	0	0

Os resultados da análise estatística encontram-se nas tabelas 2 e 3. Não houve associação significativa para o sexo, embora a frequência de fêmeas positivas tenha sido superior a dos machos. Em relação à idade, maior frequência de suínos positivos foi detectada nos reprodutores (21,2% para os reprodutores X 3,1% em suínos de terminação) com associação significativa ($p < 0,001$) para esta variável.

A concordância entre os testes de diagnóstico foi de 0,218 quando se comparou a PCR com a RIFI, 0,285 para a PCR com o bioensaio e de 0,394 para o bioensaio e RIFI, sendo todas elas consideradas regulares.

Tabela 2- Análise dos fatores associados à infecção por *Toxoplasma gondii* em relação à sorologia nos suínos de criações de subsistência no estado de Pernambuco, Brasil.

VARIÁVEL	N	ANÁLISE UNIVARIADA		P
		RIFI Positiva	OR (I.C. 95%)	
Idade				
Terminação	158	5 (3,1%)		<0,001*
Reprodução	66	14 (21,2%)	8,2 (2,8 - 23,9)	
Sexo				
Fêmea	131	9 (6,9%)	-	0,305
Macho	93	10 (10,7%)	1,6 (0,6 - 4,2)	
Tipo de Alimentação				
Restos de comida	87	5 (5,7%)	-	0,498
Ração	37	4 (10,8%)	1,9 (0,5 - 7,8)	
Mista	100	10 (10,0%)	1,8 (0,6 - 5,5)	
Sistema de criação				
Intensivo	46	4 (8,7%)	4,1 (0,3 - 4,0)	0,664
Extensivo	125	9 (7,2%)	-	
Misto	53	6 (11,3%)	1,6 (0,5 - 4,8)	
Presença de gatos				
Sim	87	9 (10,3%)	3,7 (0,4 - 30,3)	0,436
Não	104	9 (8,6%)	3,0 (0,3 - 24,8)	
Não soube informar	33	1 (3,1%)	-	

Polimerase; OR – Odds Ratio (razão de chance); IC – Intervalo de Confiança; *Associação significativa (p<0,05).

Conv
ençõe
s: N –
Total
de
amost
ras;
PCR
–
Reaçã
o em
Cadei
a da

Tabela 3- Análise dos fatores associados à infecção por *Toxoplasma gondii* em relação à PCR nos suínos de criações de subsistência no estado de Pernambuco, Brasil.

VARIÁVEL	N	ANÁLISE UNIVARIADA		P
		PCR Reagente	OR (I.C. 95%)	
Idade				
Terminação	55	5 (9,09%)		0,072
Reprodução	30	12 (40,0%)	1,7 (0,9 – 3,0)	
Sexo				
Fêmea	50	8 (16,0%)	1,0 (0,6 – 1,7)	0,935
Macho	35	9 (25,7%)	-	
Tipo de Alimentação				
Restos de comida	33	3 (9,09%)	-	0,720
Ração	12	4 (33,3%)	1,3 (0,5 – 2,9)	
Mista	40	10 (25,0%)	1,4 (0,6 – 3,1)	
Sistema de criação				

Intensivo	14	4 (28,5%)	-	
Extensivo	51	7 (13,7%)	1,5 (0,7 – 3,2)	0,464
Misto	20	6 (30,0%)	1,4 (0,6 – 3,2)	
Presença de gatos				
Sim	32	8 (25,0%)	-	
Não	41	8 (19,5%)	1,1 (0,5 – 2,5)	0,913
Não soube informar	12	1 (8,3%)	-	

Convenções: N – Total de amostras; PCR – Reação em Cadeia da Polimerase; OR – *Odds Ratio* (razão de chance); IC – Intervalo de Confiança; *Associação significativa ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

A frequência de suínos positivos observada neste estudo (38,0%) se aproxima das médias relatadas para suínos em outros estudos realizados no Brasil (VIDOTTO et al., 1990; CAVALCANTE et al., 2006; AZEVEDO et al., 2010; CADEMARTORI et al., 2014). Em explorações suinícolas tecnificadas, a prevalência é visivelmente inferior (12,5-13,4%) (PIASSA et al., 2010, MURARO et al., 2010, FERNANDES et al., 2012), pois o manejo sanitário é mais eficiente, resultando em um sistema de produção mais seguro, usado comumente em granjas comerciais. Suínos produzidos para subsistência, como é o caso dos animais deste estudo, estão sujeitos ao maior risco de infecção, pois estão mais expostos às formas infectantes do parasito no solo, água e alimentos, associado ao deficiente manejo sanitário (BEZERRA et al., 2009).

Neste estudo constatou-se um maior percentual de animais positivos na sorologia em relação à idade. Estudos recentes também demonstraram que os suínos adultos apresentaram uma maior probabilidade de positividade para *T. gondii* quando comparados aos animais mais jovens (VILLARI et al., 2009; KLUN et al., 2011; FEITOSA et al., 2014).

É importante relatar que os suínos amostrados neste estudo eram de idades variadas, mas um número significativo de animais tinha acima de um ano de idade (54/137), o que pode influenciar os resultados da sorologia. Isto foi discutido anteriormente por Dubey et al. (1995) e Klun et al. (2011) que relataram que a prevalência da toxoplasmose suína aumenta proporcionalmente de acordo com a faixa etária. Arko-Mansah et al. (2000) também verificaram aumento na frequência de suínos positivos de acordo com o avanço da idade (11% dos soropositivos para suínos entre 1 a 5 meses de idade; 36,4% entre 6 a 12 meses e 48,1% com mais de 12 meses).

A idade dos animais é um fator importante na avaliação do risco pelo consumo de carne suína e seus derivados, pois a carne *in natura* é oriunda dos animais jovens, enquanto os embutidos são produzidos com carne de animais de descarte, normalmente de maior idade e frequentemente tem mais risco de se infectarem por apresentarem um maior tempo de exposição ao parasito (SILVA et al., 2010), principalmente quando são criados em sistema de criação com manejo sanitário inadequado.

Carletti et al. (2005) apontaram maior frequência de positivos em matrizes, quando comparadas aos animais de terminação e Bezerra et al. (2009) verificaram que a positividade foi maior em animais oriundos de abates clandestinos. Desta maneira, o sistema de criação (intensivo x extensivo) e o grau de tecnificação (DA SILVA et al., 2008) são apontados como fatores de risco para a infecção em suínos. Outros estudos também indicam que o regime de criação extensivo é um fator de risco para a infecção por *T. gondii* em suínos (BEZERRA et al., 2009 ; CAVALCANTI et al., 2011; FEITOSA et al., 2014).

Neste estudo, observou-se a amplificação do DNA do *T. gondii* em algumas amostras de tecidos dos suínos soropositivos na RIFI. Desses animais, 14,1% (12/85) foram positivos na PCR para detecção do DNA do *Toxoplasma gondii*. O percentual da presença do DNA desse parasito nesses órgãos é um achado relevante, pois levanta a discussão sobre a possibilidade de uma proporção significativa de carne comercializada na região estudada estar infectada, representando assim um risco à Saúde Pública, principalmente se a carne for consumida na forma *in natura* ou má cozida (MILLAR et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2014). O resultado da PCR não significa que o parasito esteja viável na amostra, mas os resultados obtidos no bioensaio pode comprovar este risco de infecção em humanos.

Alguns estudos sobre a presença do *T. gondii* em tecidos de suínos foram realizados anteriormente, onde os autores encontraram com bastante frequência cistos teciduais em cortes comerciais, órgãos e embutidos de animais natural e experimentalmente infectados (MENDONÇA et al., 2004, DIAS et al., 2005, FRAZÃO-TEIXEIRA et al., 2006, SOUSA et al., 2006, BERGER-SCHOCH et al., 2010; FERNANDES et al., 2012). A viabilidade do parasito confirmada através do bioensaio (28,0%) nesse estudo demonstra o risco ao qual a população desta região está exposta, pois aqui, as pessoas têm o hábito de consumir esses órgãos em pratos regionais, prática esta que pode ser uma via de transmissão importante, não só para os indivíduos que ingerem, mas também para aqueles que estão envolvidos com a sua preparação.

Neste estudo não foram encontrados cistos de *T. gondii* e imunomarcações positivas nas técnicas de histopatologia e imunohistoquímica, respectivamente para *T. gondii* nos órgãos estudados. De acordo com Rosa et al. (2001), quando comparada à sorologia, a técnica de imunohistoquímica não é suficientemente sensível para o diagnóstico da toxoplasmose; desta forma, essa técnica seria mais indicada para a confirmação do agente em casos clínicos sugestivos de toxoplasmose. Contudo, a histopatologia e a imunohistoquímica não devem ser desprezadas, pois são úteis para revelar a presença do parasito e o grau das lesão encontrada e tornar possível a diferenciação entre *T. gondii* e outros agentes como *Neospora caninum*, *Sarcocystis* sp. entre outros (GIRALDI et al., 2002; PESCADOR et al., 2007).

Adicionalmente, o encontro de cistos ou taquizoítos na técnica de HE ou na imunohistoquímica vai depender se o fragmento escolhido contém as referidas formas evolutivas do parasito, o que nem sempre ocorre (DUBEY et al., 2003). Também é importante considerar a forma de infecção dos animais amostrados, pois a sensibilidade da técnica diminui em animais naturalmente infectados quando comparados às infecções experimentais. Segundo Dubey (1988), os cistos nos tecidos de suínos podem ser inferior a 1cisto/50g de tecido, sendo este o limite de detecção do parasito nas técnicas histológicas. Um completo exame neurológico do animal com o objetivo de localizar a lesão no sistema nervoso associado à utilização de vários fragmentos de tecidos na análise histopatológica e/ou imunohistoquímica contribui para o aumento da sensibilidade destas técnicas (GIRALDI et al., 2002).

Os resultados obtidos neste estudo são um indicativo da condição sanitária e do risco de infecção por *Toxoplasma gondii* em suínos de criações de subsistência e para a população na região estudada. É importante a implementação de medidas preventivas para minimizar os efeitos negativos da infecção por este protozoário em suínos nesta região do Brasil.

AGRADECIMENTOS – Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro para realização deste projeto (APQ 1492-5.05/12).

LITERATURA CITADA

ARKO-MANSAH; BOSOMPEM, K. M.; CANACOO, E. A.; WASTLING, J. M.; AKANMORI, B. D. 2000. The seroprevalence of toxoplasmosis in pigs in Ghana. *Acta Tropica*, Basel. **76**: 27-31.

BERGER-SCHOCH, A.; HERRMANN, D.; SCHARES, G.; MÜLLER, N.; BERNET, D.; DOHERR, M.; GOTTSTEIN, B. 2010. Incidence and genotypes of *Toxoplasma gondii* in the muscle of sheep, cattle and pigs in Switzerland. *Veterinary Parasitology*, **1**:(3-4) 290-297.

BEZERRA, R. A.; PARANHOS, E. B.; DEL'ARCO, A. E.; ALBUQUERQUE, G. R. 2009. Detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos criados e abatidos no Estado da Bahia, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, **18**: 78-80.

BEZERRA, R.A., CARVALHO, F.S., GUIMARÃES, L.A., ROCHA, D.S., MACIEL, B.M., WENCESLAU, A.A., LOPES, C.W.G., ALBUQUERQUE, G.R., 2012. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolation from pigs intended for human consumption in Brazil. *Veterinary Parasitology* **189**:153–161.

CADEMARTORI, B.G. ; SANTOS, L.M.J.F. ; OLIVEIRAA, F.C. ; QUEVEDOA, P. ; OLIVEIRAA, P.A.; RAMOS, T.S.; ROCHA, A.S.R.; RUAS, J.L.; FARIAS, N.A.R. 2014. Isolation and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* in naturally infected (rustic farm) pigs in southern Brazil. *Veterinary Parasitology* **203**:207–211

CAMARGO, M. E. 1974. Introdução às técnicas de imunofluorescência. *Revista Brasileira Patologia Clínica* **10**: 143–171.

CAPORALI, E. H. G., A. V. SILVA, A.O. MENDONÇA, AND H. LANGONI. 2005. Comparação de métodos para determinação da prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos dos Estados de São Paulo e Pernambuco—Brasil. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar* **8**: 19–24.

CARLETTI, R. T.; FREIRE, R.L.; SHIMADA, M. T.; RUF-FOLO, B. B.; BEGALE, L.P.; LOPES, F.M.R.; NAVARRO, I.T. 2005. Prevalência da infecção por *Toxoplasma gondii* em suínos abatidos no Estado do Paraná, Brasil. *Ciências Agrárias*. **26**: 563-568

CAVALCANTE, G.T., AGUIAR, D.M., CHIEBAO, D., DUBEY, J.P., RUIZ, V.L.A., DIAS, R.A., CAMARGO, L.M.A., LABRUNA, M.B., GENNARI, S.M., 2006. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in cats and pigs from rural western Amazon, Brazil. *Journal Parasitology* **92**: 863–864.

CAVALCANTI, E.F.T.S.F., SIMOES, S., FARIA, E.B., FERNANDES, M.F.T.S., PINHEIROJÚNIOR, J.W., MOTA, R.A., 2011. Anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* em suínos abatidos em matadouros da região metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil. *Arquivos Instituto Biológico de São Paulo* **78**: 425–428.

CLOSE, B., BANISTER, K., BAUMANS, V., BERNOTH, E-M., BROMAGE, N., BUNYAN, J., ERHARDT, W., FLECKNELL, P., GREGORY, N., HACKBARTH, H., MORTON, D. ; WARWICK, C. 1996. Recommendations for euthanasia of experimental animals: part 1. *Laboratory Animals*, **30**: 293–316.

DA SILVA, A.V., DA SILVA, R.C., ZAMPROGNA, T.O., 2010. *Toxoplasma gondii* em suínos com ênfase na contribuição brasileira. *Science Medical* **20**: 120–130

DE AZEVEDO, S.S., PENA, H.F.J., ALVES, C.J., GUIMARÃES FILHO, A.A.M., OLIVEIRA, R.M., MAKSIMOV, P., SCHARES, G., GENNARI, S.M., 2010. Prevalence de anti-*Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* antibodies in swine from Northeastern Brazil. *Revista Brasileira Parasitologia Veterinária*, **19**: 80–84.

DIAS, R.A.F.; NAVARRO, I.T.; RUFFOLO, B.B.; BUGNI, F.M.; CASTRO, M.V.; FREIRE, R.L. 2005. *Toxoplasma gondii* em linguça de carne suína tipo frescal, com investigação soroepidemiológica em trabalhadores de estabelecimentos produtores. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, **47**:(4)185-189.

DOS SANTOS CBA, DE CARVALHO ACFB, RAGOZO AMA, SOARES RM, AMAKU M, YAI LEO, DUBEY JP, GENNARI SM. 2005. First isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from finishing pigs from São Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology*. **131**:207–211.

DUBEY, J. P.; MURRELL, K. D.; FAYER, R.; SCHAD, G. A. 1986. Distribution of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in commercial cuts of pork. *Journal of the American Veterinary Association*, **188**:1035-1037.

DUBEY, J. P. et al. 1995. Sources and reservoirs of *Toxoplasma gondii* infection on 47 swine farms in Illinois. *Journal Parasitology*, **81**: 723-729.

DUBEY, J. P. 1998. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. *Veterinary Parasitology*, **74**:75-77.

DUBEY, J. P., D. E. HILL, J. L. JONES, A. W. HIGHTOWER, E. KIRKLAND, J. M. ROBERTS, P. L. MARCET, T. LEHMANN, M. C B. VIANNA, K. MISKA, C. SREEKUMAR, O. C H. KWOK, S. K. SHEN, AND H. R. GAMBLE. 2005. Prevalence of viable *Toxoplasma gondii* in beef, chicken and pork from retail meat stores in the United States: Risk assessment to consumers. *Journal of Parasitology* **91**:1082–1093.

DUBEY, J. P. 2009. Toxoplasmosis in pigs—The last 20 years. *Veterinary Parasitology* **164**: 89–103.

DUBEY, J.P. 2010. *Toxoplasmosis of animals and humans*, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, 313 p.

DUBEY, J. et al. 2012 High prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from organic pigs in northern USA. *Veterinary Parasitology* **188**: 14– 18.

FEITOSA, T. F, VILELA, V. L. R., MELO, L. R. B, NETO, J. L. A, SOUTO, D. V. O, MORAIS, D. F, ATHAYDE, A. C. R, AZEVEDO, S.S, PENA, H. F. J., 2014. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in slaughtered pigs from Northeast, Brazil. *Veterinary Parasitology* **202**: 305–309

FERNANDES, E.F.T.S., FERNANDES, M.F.T.S., KIM, P.C.P., DE ALBUQUERQUE, P.P.F., NETO, O.L.S., SANTOS, A.S., DE MORAES, É.P.B.X., DE MORAIS, E.G.F., MOTA, R.A., 2012. Study of *Toxoplasma gondii* in slaughtered swine in the state of Pernambuco, Brazil. *Journal Parasitology* **98**: 690–691.

FRAZÃO-TEIXEIRA E.; OLIVEIRA F.C.R.; PELISSARI-SANT'ANA V.; LOPES C.W.G. 2006. *Toxoplasma gondii* em encéfalos de suínos comercializados no município de Campos dos Goytacazes, estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, **15**:(1)33-36.

FRAZÃO-TEIXEIRA, E., SUNDAR, N., DUBEY, J.P., GRIGG, M.E., DE OLIVEIRA, F.C.R., 2011. Multi-locus DNA sequencing of *Toxoplasma gondii* isolated from Brazilian pigs identifies genetically divergent strains. *Veterinary Parasitology* **175**: 33–39.

GARCIA, J. L., GENNARI, S. M., MACHADO, R. Z., NAVARRO T. I. 2006. *Toxoplasma gondii*: detecção por bioensaio, histopatologia e reação em cadeia da polimerase em tecidos de suínos infectados experimentalmente. *Experimental Parasitology* **113**:267-271.

GIRALDI, J. H.; BRACARENSE, A. P. F. R. L.; VIDOTTO, O.; TUDURY, E. A.; NAVARRO, I. T.; BATISTA, T. N. 2002. Sorologia e histopatologia de *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em cães portadores de distúrbios neurológicos. *Semina*, **23**: 9-14,

HOMAN W.L., VERCAMMEN M., DE BRAEKELEER J. & VERSCHUEREN H. 2000. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *Int. Journal Parasitology* **30**:69-75.

KLUN et al. 2011. *Toxoplasma gondii* infection in slaughter pigs in Serbia: seroprevalence and demonstration of parasites in blood. *Veterinary Research* **42**:17.

KWOK, S. 1990. Procedures to minimize PCR-product carry-over. In *PCR protocols: A guide to methods and applications*, M. A. Innis, D. H. Gelfand, T. Sninsky, and J. J. White (eds.). Academic Press, New York, New York, 482 p.

LOPES, A.P., DUBEY, J.P., NETO, F., RODRIGUES, A., MARTINS, T., RODRIGUES, M., CARDOSO, L., 2012. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in cattle, sheep, goats and pigs from the North of Portugal for human consumption. *Veterinary Parasitology* **193**: 266–269.

- MENDOÇA, A.O.; DOMGUES, P.F.; SILVA, A.V.; PEZERICO, S.B.; LANGONI, H. 2004. Detection of *Toxoplasma gondii* in swine sausages. *Parasitología Latinoamericana*, **59**: (1-2)42-45.
- MILLAR, P. R.; DAGUER, H.; VICENTE, R. T.; DA COSTA, T.; SOBREIRO, L. G. ; AMENDOEIRA, M. R. R. 2008. *Toxoplasma gondii*: estudo soro-epidemiológico de suínos da região Sudoeste do Estado do Paraná. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **28**: 1.
- MURARO, L.S., CARAMORI JÚNIOR, J.G., AMENDOEIRA, M.M.R., PEREIRA, J.A., OLIVEIRA FILHO, J.X., VICENTE, R.T., NEVES, L.B., NICOLAU, J.L., IGARASHI, M., MOURA, S.T., 2010. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in swine matrices in Nova Mutum e Diamantino, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Revista Brasileira Parasitologia Veterinária*, **19**: 254–255.
- OLIVEIRA, P.A.; OLIVEIRA, F.C.; FARIA, L.M.J.; CADEMARTORI, B.G.; PEREIRA, C.M.; COELHO, A.C.B.; PAPPEN, F.G.; FARIAS, N.A. 2014. Patogenicidade e virulência de *Toxoplasma gondii* isolado de suínos de criação artesanal no sul do Brasil, *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **34**: (12)1186-1190.
- PESCADOR, C.A.; CORBELLINI, L.G.; OLIVEIRA, E.C.; BANDARRA, P.M.; LEAL, J.S.; PEDROSO, P.M.O.; DAVID DRIEMEIER, D. 2007. Aborto ovino associado com infecção por *Sarcocystis* sp. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **10**: 27-33.
- PIASSA, F.R., DE ARAÚJO, J.B., DA ROSA, R.C., MATTEI, R.J., DA SILVA, R.C., LANGONI, H., DA SILVA, A.V., 2010. Prevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in certified and non-certified pig breeding farms in the Toledo microregion, PR, Brazil. *Revista Brasileira Parasitologia Veterinária*, **19**: 152–156
- RICHOMME, C., D. AUBERT, E. GILOT-FROMONT, D. AJZENBERG, MERCIER, C. DUCROT, H. FERTÉ, D. DELORME, and I. VILLENA. 2009. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from wild boar (*Sus scrofa*) in France. *Veterinary Parasitology* **164**:296–300.
- SOUSA, S.; AJZENBERG, D.; CANADA, N.; FREIRE, L.; COSTA, J.M.C.; DARDÉ, M.L. THULLIEZ, P., DUBEY, J.P. 2006. Biologic and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs from Portugal. *Veterinary Parasitology*, **135**:(2)133-36.
- TENTER, A. M., A. R. HECKROTH, AND L. M. WEISS. 2000. *Toxoplasma gondii*: From animals to humans. *International Journal for Parasitology* **30**: 1217–1258.
- THRUSFIELD, M. V. **Epidemiologia Veterinária**. 2ª ed. São Paulo: Roca, 2004. 556p.
- VIDOTTO, O., NAVARRO, I.T., GIRALDI, N., MITSUKA, R., FREIRE, R.L., 1990. Estudos epidemiológicos da toxoplasmose em suínos da região de Londrina – PR. *Semina Ciências Agrárias* **11**:53–59.

VILLARI, S., VESGO, G., PETERSEN, E., CISPO, A., BUFFOLANO, W., 2009. Risk factors for toxoplasmosis in pigs bred in Sicily. *Veterinary Parasitology* **161**: 1–8.

YAI, L. E. O.I; VIANNA, M. C. B., SOARES R. M., CORTEZ, A., FREIRE R. L., RICHTZENHAIN, L J, GENNARI S.M. 2003. Evaluation of experimental *Toxoplasma gondii* (Nicolle and Manceaux, 1909) infection in pigs by bioassay in mice and polymerase chain reaction. *Brazil Journal Veterinary Research Animal Science* **40**: 227-234.

4.2 ARTIGO

Detecção molecular, genotipagem e análise filogenética de isolado de *Toxoplasma gondii* em suínos abatidos para o consumo humano na região nordeste do Brasil.

(Formatado para o periódico Acta Tropica)

Detecção molecular, genotipagem e análise filogenética de isolado de *Toxoplasma gondii* em suínos abatidos para o consumo humano na região nordeste do Brasil.

Resumo: O objetivo deste estudo foi isolar e genotipar de *T. gondii* de suínos abatidos para consumo humano na região nordeste do Brasil. Inicialmente foi realizada a técnica de Imunofluorescência Indireta dos soros para a triagem dos suínos positivos. Posteriormente, amostras de tecidos (pulmão, fígado, coração, diafragma e cérebro) dos animais que tiveram títulos de anticorpos na RIFI ≥ 64 foram submetidas ao bioensaio em camundongos. Foram utilizados 15 *pools* de tecidos de onde se obteve um isolado de *Toxoplasma gondii*. A variabilidade genética desse isolado foi avaliada pela técnica polimorfismo do comprimento de fragmentos gerados por enzimas de restrição (PCR-RFLP) utilizando-se 11 marcadores (SAG1, SAG2, *alt*SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c228, c292, L358, PK1 e APICO). Foram utilizadas as cepas do *T. gondii* RH, ME49 e VEG, que pertencem aos tipos I, II, III respectivamente, como padrão na caracterização genotípica do isolado de suínos. Após esta análise genética foi identificado o genótipo #65 (ToxoDB), considerado como uma cepa atípica. Este é o primeiro registro do genótipo #65 em suínos no mundo, indicando a necessidade de se realizar outros estudos em suínos nesta região para determinar a variabilidade genética nesta espécie e as possíveis implicações para a Saúde Pública.

Palavras-chave: Genótipo, Toxoplasmose, Suíno, PCR-RFLP

Abstract: The objective of this study was to isolate and genotype the *T. gondii* of pigs slaughtered for human consumption in northeastern Brazil. Initially, was realized the Indirect Immunofluorescence Technique (IFA) of sera for screening the positive pigs. Subsequently, tissue samples (lung, liver, heart, diaphragm and brain) of the animals that had antibody titers in IFA ≥ 64 were submitted to bioassay in mice. 15 pools of tissues were used, of which, was obtained one isolate. The genetic variability of this isolated was evaluated by the Restriction Fragment Length Polymorphism technique generated by restriction enzymes (RFLP-PCR) using 11 markers (SAG1, SAG2, *alt*SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c228, c292, L358, PK1 e APICO). Were used the RH, ME49 and VEG strains of *T. gondii*, that belong to types I, II and III respectively as default in genetic characterization of isolated swines. After this genetic analysis was identified genotype # 65 (ToxoDB), considered as an atypical strain. This is the first record of genotype # 65 in pigs in the world, indicating the need for more studies in pigs in this region to determine the genetic variability in this species and the possible implications for public health.

Keywords: Genotype, Toxoplasmosis, Swine, PCR-RFLP

Introdução

Toxoplasma gondii é um protozoário intracelular obrigatório com uma ampla distribuição mundial. Tem como hospedeiros intermediários todos os animais homeotérmicos, entretanto, apenas membros da família *Felidae* são hospedeiros definitivos do parasito (Dubey, 2004). As duas principais vias de transmissão deste parasito são a ingestão de oocistos em alimentos ou água contaminados e a ingestão de cistos viáveis presentes na carne crua ou mal cozida (Dubey, 2010). Estima-se que aproximadamente um terço da população humana no mundo esteja infectada na fase crônica (Peng et al., 2011). Em pacientes imunocomprometidos, a toxoplasmose pode ser grave ou até mesmo fatal e durante a gestação pode causar abortos e lesões irreversíveis ao feto (Remington et al., 2005; Pereira-Chiocola et al., 2009).

Diferentes técnicas moleculares foram desenvolvidas, descritas e utilizadas para estudar a diversidade genotípica dos isolados de *T. gondii*, sendo as mais utilizadas a amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD), polimorfismo do comprimento de fragmentos gerados por enzimas de restrição (PCR-RFLP), marcadores microssatélites (sequências simples repetidas- SSR) e sequenciamento (Howe e Sibley, 1995; Ferreira et al., 2004; Yai et al., 2009; Zhou et al., 2009; Silva et al., 2011). Através destas técnicas moleculares tornou-se possível diagnosticar e compreender melhor a epidemiologia, a genética e a filogenia do *T. gondii* (Su et al., 2010).

Inicialmente a população de *T. gondii* foi classificada como sendo de baixa variabilidade genética, com estrutura altamente clonal, consistindo em três linhagens genéticas: tipo I, II e III (Howe; Sibley, 1995; Ajzenberg et al., 2002). Os avanços nos estudos moleculares e o desenvolvimento da PCR-RFLP possibilitaram distinguir cada uma das três cepas utilizando 11 marcadores, revelando assim a diversidade genética do *T. gondii* (Su et al., 2010). Dubey e Su (2009); Velmurugan, Su e Dubey (2009) também a partir da técnica de PCR-RFLP concluíram que as linhagens clonais II e III são predominantes e que as cepas atípicas são raras nos EUA. Em contrapartida, estudos recentes de genotipagem de cepas de *T. gondii* isoladas na América do Sul revelaram uma alta frequência de genótipos atípicos, sugerindo uma alta diversidade da população de *T. gondii* (Su et al., 2006). No Brasil foram descritas cepas atípicas revelando a importância desses isolados (Pena et al., 2008; Frazão-Teixeira et al., 2011; Ferreira et al., 2011; Dubey et al., 2012).

Alguns estudos compararam geneticamente os isolados obtidos a partir de suínos com os isolados identificados em casos de toxoplasmose humana (Dubey, 2009). No entanto, no Brasil, ainda são poucos os trabalhos de genotipagem. Em suínos, os tipos I e III foram descritos

(Santos et al., 2005) bem como cepas atípicas, sendo algumas destas nunca relatadas no Brasil (Frazão-Teixeira et al., 2011; Bezerra et al., 2012; Clementino Andrade et al., 2013).

T. gondii é um parasito que não pode ser detectado pelos métodos atuais de inspeção sanitária da carne (Dubey; Jones, 2008) e os estudos genéticos podem explicar de forma mais clara o papel dos suínos na cadeia epidemiológica da transmissão da toxoplasmose para humanos. Desta forma, objetivou-se neste estudo isolar e genotipar uma cepa de *T. gondii* isolada de suíno de criação de subsistência e abatido para consumo humano na região nordeste do Brasil.

Material e Métodos

Aspectos éticos

Este estudo foi realizado após aprovação pelo comitê de ética no uso de animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil (processo n^o. 015533/2012-71).

Colheita de amostras

Foram utilizadas amostras de sangue e tecidos (coração, pulmão, fígado, cérebro e diafragma) de 92 suínos abatidos em matadouros no Estado de Pernambuco, região nordeste do Brasil. As amostras de sangue foram colhidas por punção da veia cava cranial dos suínos no momento do abate e os tecidos foram colhidos no momento da evisceração, seguindo a lenda de abate do estabelecimento. Todas as amostras foram acondicionadas e mantidas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável até o momento das análises.

Bioensaio

Antes de realizar o bioensaio, as amostras de soro dos suínos foram submetidas à técnica de RIFI (Camargo, 1974) e os tecidos dos animais que apresentaram títulos ≥ 64 foram utilizados na bioprova, empregando a técnica de digestão péptica (Dubey, 1998). Para a bioprova foram utilizados 15 *pools* de tecidos contendo pulmão, fígado, coração, diafragma e cérebro. De cada órgão foi pesado aproximadamente 16,6g até completar o total de 50g por *pool* e inoculado após a digestão em camundongos Swiss Webster (25-30g) na dose de 1 mL por animal pela via subcutânea. Os camundongos foram observados diariamente durante 60 dias e eutanasiados ao

final deste período com injeção intraperitoneal de tiopental sódico diluído em solução fisiológica na dose 200mg/Kg de peso (Close et al., 1996).

Extração do DNA e PCR de tecidos camundongos

Para confirmar a infecção por *T. gondii*, após a eutanásia dos camundongos foram coletadas amostras de cérebro, coração, fígado e pulmão que foram submetidas à PCR.

Inicialmente foi realizada a extração de DNA dos órgãos com o kit comercial “Qiagen DNA Easy Blood and Tissues Kit” (Qiagen®), utilizando-se o protocolo do fabricante. As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 12,5µL contendo: 2,5µL de DNA genômico, 0,5µM de cada iniciador, 2,75µL de Água Mili-Q ultrapura e 6,25µL de MasterMix (Qiagen). O perfil térmico das etapas das reações foi feita em termociclador MJ-96G (Bicycle Co. Ltd, Hangzhou - China), seguindo o protocolo descrito por Homan et al. (2000). Os pares de iniciadores utilizados foram TOX-4 (CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG) TOX-5 (CGCTGCAGACA CAGTGCATCTGGATT) que amplifica uma região com 529 pares de base. Os produtos amplificados foram detectados por eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com *blue green* e visualizados através de luz ultravioleta e fotodocumentados. O controle positivo da reação foi uma suspensão de taquizoítos da cepa RH na concentração de 10⁴ taquizoítos/mL para extração do DNA parasitário e como controle negativo foi utilizado água ultrapura.

Sequenciamento

Para o sequenciamento do isolado obtido, o produto amplificado foi purificado empregando kit comercial GFX™ PCR DNA e kit de purificação de bandas em gel de agarose GE Healthcare. Utilizou-se o sequenciador ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems) e as reações foram realizadas em ambas as cadeias utilizando iniciadores (TOX4 e TOX5) de acordo com o Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems); as condições de polimerização foram realizadas em placas de 96 poços de acordo com as instruções do fabricante. As sequências foram analisadas através BIOEDIT e MEGA 5 software e comparadas com o banco de dados do NCBI usando BLAST.

Multilocus – PCR-RFLP

A genotipagem do isolado obtido foi feita por PCR-RFLP, utilizando 11 marcadores genotípicos (SAG1, SAG2, alt. SAG2, SAG3, BTUB, GRA6, c22-8, c29-2, L358, PK1 e Apico) conforme descrito por SU et al. (2006). A sequência de DNA alvo foi primeiro amplificada por PCR multiplex usando os *primers* externos para todos os marcadores, seguido por nested-PCR para marcadores individuais. Em seguida, os produtos de nested-PCR foram digeridos com as enzimas de restrição e as condições de temperatura e de tempo específica para cada marcador (Tabela 1). Todos os produtos foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 3%, coradas com Sybr Safe DNA Gel Stain (Invitrogen®, USA) e visualizadas através do Safe Imager TM (Invitrogen®, EUA). Os resultados foram identificados, comparados, e classificados de acordo com os genótipos presentes em ToxoDB em <http://toxodb.org/toxo/>

Tabela 1. Segmentos de DNA utilizados na análise de RFLP, com os iniciadores para amplificação e as endonucleases de restrição de polimorfismo.

Marcador	Cromossomo	Iniciadores	PCR (pb)	Endonucleases de restrição	Referência
SAG1	VIII	(F) CAATGTGCACCTGTAGGAAGC (R) GTGGTTCTCCGTCGGTGTGAG	390	<i>Sau96I + HaeIII</i>	Grigg et al. 2001
5'SAG2	VIII	(F) GAAATGTTTCAGGTTGCTGC (R) GCAAGAGCGAACTTGAACAC	242	<i>MboI</i>	Howe et al. 1997; Su et al. 2006
3'SAG2	VIII	(F) ATTCTCATGCCTCCGCTTC (R) AACGTTTCACGAAGGCACAC	222	<i>HhaI</i>	Howe et al. 1997
SAG3	XII	(F) TCTGTGCGGGTGTCACTCA (R) CACAAGGAGACCGAGAAGGA	225	<i>NciI</i>	Grigg et al. 2001
BTUB	IX	(F) GAGGTCATCTCGGACGAACA (R) TTGTAGGAACACCCGGACGC	411	<i>BsiEI + TaqI</i>	Khan et al. 2005b; Su et al. 2006
GRA6	X	(F) TTTCCGAGCAGGTGACCT (R) TCGCCGAAGAGTTGACATAG	344	<i>MseI</i>	Khan et al. 2005b; Su et al. 2006
C22-8	Ib	(F) TCTCTACTGCGGACGCC (R) AGGTGCTTGATATTGCG	521	<i>BsmAI + MboI</i>	Khan et al. 2005b; Su et al. 2006
C29-2	III	(F) AGTTCTGCAGAGTGTGCG (R) TGTCTAGGAAAGAGGCGC	446	<i>HpyCH4IV + RsaI</i>	Khan et al. 2005b; Su et al. 2006
L358	V	(F) AGGAGGCGTAGCGCAAGT (R) CCCTCTGGCTGCAGTCT	418	<i>HaeIII + NlaIII</i>	Khan et al. 2005b; Su et al. 2006
PK1	VI	(F) CGCAAAGGGAGACAATCACT (R) TCATCGCTGAATCTCATTGC	903	<i>AvaI+RsaI</i>	Khan et al. 2005b; Su et al. 2006
SAG2-new	VIII	(F) TGCAAATCTTGAATTCTCAGTT (R) ATTTGACACCGGGAGCAC	546	<i>HinfI+TaqI</i>	Khan et al. 2005b; Su et al. 2006
Apico	Plastid	(F) GCAAATCTTGAATTCTCAGTT (R) GGGATTGCAACCCCTTGATA	640	<i>AflIII+DdeI</i>	Su et al. 2006

Análise Filogenética

Para a realização da análise filogenética, os padrões de bandas da eletroforese (dados genotípicos de polimorfismo de restrição) obtidas pelos cortes das enzimas na PCR-RFLP do isolado foram transformados em dados binários (“0”, ausência de banda; “1”, presença de banda) e tabulados, de acordo com o marcador, em programa específico de reconstrução filogenética, Split Tree (Huson; Bryant, 2006) para obter a relação filogenética entre o genótipo obtido no estudo e os outros já isolados no Brasil e no mundo.

Resultados

Anticorpos contra *T. gondii* foram encontrados em 54,3% (50/92) dos suínos analisados.

No bioensaio foi obtido um isolado de *T. gondii*. Os camundongos positivos no bioensaio apresentaram sinais clínicos compatíveis com a toxoplasmose aguda como letargia, fotofobia, pelos eriçados e diarreia aos seis dias pós-inoculação (d.p.i.). Esses animais foram eutanasiados e no lavado peritoneal foram observados taquizoítos.

Na PCR, o isolado exibiu bandas compatíveis (529 pb) com o controle positivo da reação e no sequenciamento foi encontrada uma similaridade de 99,9% com as sequências de DNA do *T. gondii* armazenadas no genbank (DQ779196.1). O isolado foi submetido a PCR-RFLP que identificou o genótipo #65, considerado como cepa atípica (Tabela 2).

Tabela 2- Caracterização genotípica dos isolados de *Toxoplasma gondii* obtidos de suínos abatidos em Pernambuco, 2014.

Amostra	Marcadores													
	SAG1	5'-SAG2	3'-SAG2	(5'+3')	alt.SAG2	SAG3	BTUB	GRA6	c22-8	c29-2	L358	PK1	Apico	Genotype ToxoDB
2	I	I/II	I/III	I	II	III	III	III	u-1	I	I	III	I	#65

Com base em outras cepas atípicas descritas para a espécie suína, construiu-se uma árvore filogenética (Figura 1).

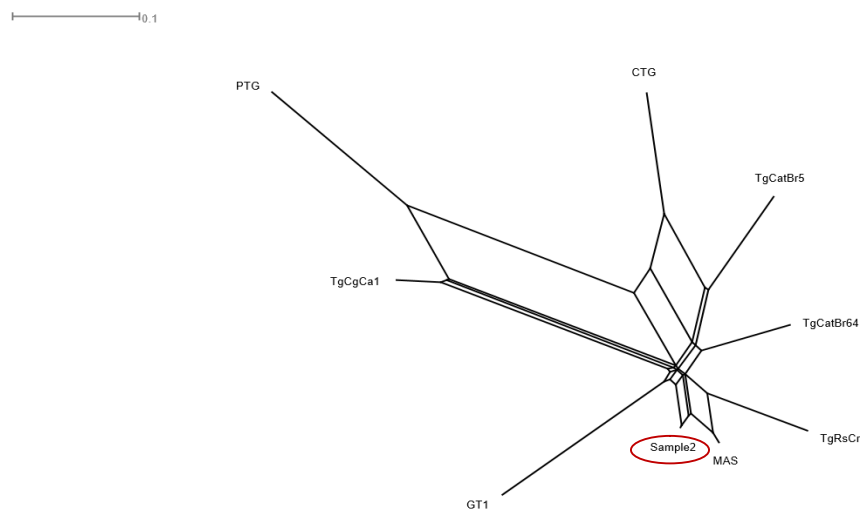


Fig. 1 - Análise filogenética do isolado de *T. gondii* obtido neste estudo (círculo vermelho), utilizando como referência as cepas: MAS, GT1, TgRsCr, TgCgCa1, Tg CatBr64, TgCatBr5, PTG e CTG.

Discussão

Neste estudo, a frequência de *T. gondii* em suínos foi de 54,3%. Na região nordeste do Brasil, Bezerra et al. (2009) verificaram positividade em 46,8% dos suínos amostrados em matadouros no estado da Bahia, e em outros estudos com suínos abatidos para o consumo humano nos estados da Paraíba e Pernambuco foram relatadas frequências de 9,7%, 19,5% e 36,2% (Fernandes et al., 2011; Azevedo et al., 2010; Feitosa et al., 2014), respectivamente. Esta frequência elevada de suínos positivos em criações de subsistência indica que existe uma maior contaminação do ambiente onde estes suínos são criados. Este sistema de criação não tecnificado e manejo sanitário inadequado permite o contato com o hospedeiro definitivo que pode contaminar água e alimentos. Bezerra et al. (2009) afirmam que o grau de tecnificação é um fator

determinante para a infecção de *T. gondii* em criações de suínos, pois o deficiente manejo sanitário nestas criações favorece a disseminação deste parasito.

A taxa de isolamento no bioensaio obtido nesse estudo foi baixa em relação a outras pesquisas realizadas com suínos no Brasil (Frazão-Teixeira et al., 2011; Feitosa et al., 2014). *T. gondii* foi isolado em 2% dos suínos com títulos ≥ 64 na RIFI. Este resultado pode significar que a densidade dos cistos do *T. gondii* na carne de suínos é baixa como observado no estudo de Dubey (2009) que encontrou cerca de um cisto por 25g de tecido. Para o presente estudo utilizou-se 50g de tecidos de suínos sorologicamente positivos. De acordo com Dubey et al. (2005), o isolamento bem sucedido pode variar dependendo do bioensaio, da quantidade de tecido utilizado e da concentração do parasito nas amostras de tecido. A bioprova realizada em gatos frequentemente apresenta aumento nas taxas de isolamento quando comparada com os bioensaios em camundongos, devido principalmente ao maior volume de tecido utilizado (Dubey, 2009).

Este é o primeiro isolado de *T. gondii* genotipado em suínos no Estado de Pernambuco, Brasil e o primeiro relato do genótipo #65 em suínos no mundo. Até o momento o genótipo #65 foi descrito em felinos (Pena et al., 2008), galinhas e pombos (Dubey et al., 2008; Barros et al., 2014) e seres humanos com quadro clínico de toxoplasmose aguda (Ferreira et al., 2012). Fica evidente a circulação do genótipo #65 em hospedeiros definitivos e intermediários, incluindo os suínos e humanos com quadro agudo da doença no Brasil. Isto demonstra a importância da genotipagem de isolados para compreender melhor a epidemiologia molecular da toxoplasmose.

O genótipo #65 é classificado como uma cepa atípica. Dentre os genótipos atípicos previamente descritos em suínos no mundo e no Brasil estão #1, #2 (Zhou et al., 2010), #9, #3 (Jiang et al., 2013); no Brasil #109, #116, #13, #1, #2 (Clementino Andrade et al., 2013). Observa-se uma frequência maior de cepas do tipo II e III em suínos no mundo, enquanto no Brasil há uma predominância do tipo I e III (Dubey, 2009; Dubey et al., 2012).

Estudos realizados no Brasil com isolados de *T. gondii* de diversos hospedeiros mostraram uma alta diversidade genética que difere dos isolados em países do hemisfério norte (Dardé, 2004; Ferreira et al., 2006). Essa alta frequência de genótipos recombinantes na América do Sul se caracteriza por novas e diferentes combinações dos alelos arquetípicos (I, II e III) em todos os locus estudados (Ferreira et al., 2006). Entretanto, segundo Frazão-Teixeira et al. (2011), os isolados brasileiros não devem ser classificados como recombinantes de cepas arquetípicas, como proposto anteriormente por Ferreira et al. (2006), e sim como atípicos por possuírem novas combinações de alelos únicos além de alguns alelos arquetípicos. Pesquisadores

sugerem que a população de *T. gondii* é única na América do Sul, pois divergem geneticamente e biologicamente das encontrados no resto do mundo (Frazão-Teixeira et al., 2011; Bezerra et al., 2012).

A PCR-RFLP foi utilizada para a caracterização genotípica, pois possui a capacidade de diferenciação dos alelos atípicos (u-1, u-2) e detecção da combinação dos alelos de diferentes arquetípicos, além de ser de fácil utilização e alta resolução (Su et al., 2006). Em síntese, a aplicação de uma técnica integrada, combinando a detecção molecular, genética populacional e a filogenia do *T. gondii*, pode auxiliar no controle da transmissão e a redução da toxoplasmose em humanos e animais, pois vai gerar informações valiosas para melhorar a compreensão da epidemiologia e da população desse protozoário (Su et al., 2010).

A relação filogenética do isolado de *T. gondii* de suíno foi analisada utilizando o software SplitsTree4 (Huson, 1998; Huson ; Bryant, 2006). As redes filogenéticas apresentadas na figura 1 tem topologia semelhante com os isolados de referência MAS, TgRsCr, GT1. O resultado mostra a alta diversidade genética do *T. gondii* no Brasil ao se comparar o isolado obtido de suínos com os isolados associados de diferentes hospedeiros e regiões.

Conclusão

Este é o primeiro registro do genótipo #65 em suínos no mundo, indicando a necessidade de se realizar outros estudos em suínos nesta região para determinar a variabilidade genética nesta espécie e as possíveis implicações para a Saúde Pública.

AGRADECIMENTOS – Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro para realização deste projeto (APQ 1492-5.05/12).

Referências

Ajzenberg D, Cogné N, Paris L, Bessières M.H, Thulliez P, Filisett I.D, Pelloux H, Marty P, Dardé ML (2002) Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. *Journal Infectious Diseases*. 186:684-689. doi: 10.1086/342663.

Azevedo SS, Pena HFJ, Alves CJ, Guimarães AAM, Maksimov P, Schares G, Gennari SM (2010) Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti- *Neospora caninum* antibodies in swine from northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária (Online)*, 19: 80-84. doi.org/10.4322/rbvp.01902002

Barros LD, Taroda A, Zulpo DL, Da Cunha IAL, Sammi AS, Cardim ST, Miura AC, Su C, Machado RZ, Vidotto O, Garcia JL (2014) Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from eared doves (*Zenaida auriculata*) in Brazil. *Braz. J. Vet. Parasitol*, 23:443-448 doi: 10.1590/S1984-29612014073

Bezerra RA, Paranhos EB, Del`Arco AE, Albuquerque GR (2009) Detecção de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em suínos criados e abatidos no Estado da Bahia, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 18:(3)78-80. doi.org/10.4322/rbpv.01803015

Bezerra RA, Carvalho FS, Guimarães LA, Rocha DS, Maciel BM, Wenceslau AA, Lopes CWG, Albuquerque GR (2012) Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs intended for human consumption in Brazil. *Veterinary Parasitology*, 189:153-161. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.04.036

Camargo ME (1964) Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis of toxoplasmosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 6:117-118.

Clementino-Andrade MM, Pinheiro BV, Cunha MM, Carneiro ACAV, Andrade Neto VF, Vitor RWA. (2013) New genotypes of *Toxoplasma gondii* obtained from farm animals in Northeast Brazil. *Research in Veterinary Science* 94:587–58. doi: 10.1016/j.rvsc.2013.01.006

Close B, Banister K, Baumans V, Bernoth EM, Bromage N, Bunyan J, Erhardt W, Flecknell P, Gregory N, Hackbarth H, Morton D, Warwick C (1996) Recommendations for euthanasia of experimental animals: part 1. *Laboratory Animals*, 30:293–316. doi:10.1258/002367790780890347

Dardé ML (2004) Genetic analysis of the diversity of *Toxoplasma gondii*. *Ann. Istitute Super Sanità*, 40:57-63.

Dubey JP (1998) Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. *Veterinary Parasitology*.74:75-77. DOI: 10.1016/S0304-4017(97)00135-0

Dubey JP (2004) Toxoplasmosis: a waterborne zoonosis. *Veterinary Parasitology*, 126:(1-2)57-72. doi:10.1016/j.vetpar.2004.09.005

Dubey J.P., Hill D.E., Jones J.L., Hightower A.W., Kirkland E., Roberts J.M., Marcet P.L., Lehmann T., Vianna M.C.B., Miska K., Sreekumar C., Kwok O.C.H., Shen S.K.; Gamble H.R. (2005). Prevalence of viable *Toxoplasma gondii* in beef, chicken and pork from retail meat stores in the United States: Risk assessment to consumers. *Journal Parasitology* 91:1082-1093. doi: 10.1645/GE-1471.1

Dubey JP, Jones JL (2008) *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *International Journal for Parasitology*.38:1257-1278. doi: 10.1016/j.ijpara.2008.03.007

Dubey JP, Velmurugan GV, Chockalingam A, Pena HFJ, Oliveira LN, Leifer CA, Gennari SM, Oliveira LMGB, Su C (2008) Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Brazil. *Veterinary Parasitology*. 157:299-305. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.07.036

Dubey JP (2009b) Toxoplasmosis in pigs- The last 20 years. *Veterinary Parasitology*. 164: 89-103.

Dubey JP, Su C. (2009). Population biology of *Toxoplasma gondii*: what's out and where did they come from. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*.104:190- 195. doi.org/10.1590/S0074-02762009000200011

Dubey JP (2010). *Toxoplasma gondii* infections in chickens (*Gallus gallus domesticus*): prevalence, clinical disease, diagnosis and public health significance. *Zoonoses Public Health*, 57:60-73. doi: 10.1111/j.1863-2378.2009

Dubey JP, Hill DE, Rozeboom DW, Rajendrana C, Choudhary S, Ferreira LR, Kwok OCH, Su C. (2012). High prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from organic pigs in northern USA. *Veterinary Parasitology*. 188:14-18. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.03.008

Feitosa TF, Vilela VL, De Melo LR, De Almeida Neto JL, Souto DV, De MoraisDF, Athayde AC, Azevedo SS, Pena HF (2014). *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in slaughtered pigs from Northeast, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 28:(3-4):305-9. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.03.015.

Fernandes EFT, Simões SG, Faria EB, Samico Fernandes MFT, Pinheiro Júnior JW, Mota RA (2011). Anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* em suínos abatidos em matadouros da região metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil. *Arq. Inst. Biológico*, v. 78:(3)425-428.

Ferreira AM, Vitor RW, Carneiro ACAV, Brandão GP, Melo MN (2004). Genetic variability of Brazilian *Toxoplasma gondii* strains detected by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (RAPD-PCR) and simple sequence repeat anchored-PCR (SSRPCR) *Infect Genet Evol*,4:131-142. doi.org/10.1371/journal.pbio.1001358.

Ferreira AM, Vitor RW, Gazzinelli RT, Melo MN (2006) Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. *Infect Genet Evol*, 6: 22-31. DOI: 10.1016/j.meegid.2006.12.004

Ferreira IMR, Vidal JE, De Matos CCB, De Matos LC, Qu D, Su, C, Pereira-Chiocolla VL (2011). *Toxoplasma gondii* isolates: Multilocus RFLP-PCR genotyping from human patients in São Paulo State, Brazil identified distinct genotypes. *Experimental Parasitology*, 129: 190-195. doi: 10.1016/j.exppara.2011.06.002

Frazão-Teixeira E, Sundar N, Dubey JP, Grigg ME, Oliveira FCR (2011). Multi-locus DNA sequencing of *Toxoplasma gondii* isolated from Brazilian pigs identifies genetically divergent strains. *Veterinary Parasitology*,175:33-39. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.09.030

- Jiang HH, Huang SY, Zhou DH, Zhang X, Su, C, Deng SZ, ZHU XQ (2013) Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from pigs from different localities in China by PCR-RFLP. *Parasites and Vectors*. 6:227. doi:10.1186/1756-3305-6-227
- Homan WL, Vercammen M, De Braekeleer J, Verschueren H (2000) Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *Int J Parasitol*, 30:69-75. doi: 10.1016/S0020-7519(99)00170-8.
- Howe DK, Sibley LD (1995) *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages correlation of parasite genotype with human disease. *Journal of Infectious Diseases*, 172: 1561-1566.
- Huson DH, Bryant D (2006). Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol. Biol. Evol.*, 23:254-267. doi: 10.1093/molbev/msj030
- Pena HFJ, Gennari SM, Dubey JP, Su C. (2008) Population structure and mousevirulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *International Journal for Parasitology*. 38: 561-569.
- Peng HJ, Chen XG, Lindsay DS (2011). A review: competence, compromise, and concomitance: reaction of the host cell to *Toxoplasma gondii* infection and development. *Journal Parasitology* 97: 620–628. doi: 10.1645/GE-2712.1
- Pereira-Chioccola VL, Vidal JE, Su C. (2009) *Toxoplasma gondii* Infection and Cerebral Toxoplasmosis in HIV-Infected Patients. *Future Microbiology*, 4(10):1363–1379. doi: 10.2217/fmb.09.89
- Remington JS, Mcleod R, Thulliez P, Desmots G. (2005). Toxoplasmosis. *Infect dis fetus newborn infant*, 947-1091.
- Santos CBA, De Carvalho ACFB, Ragozo AMA, Soares, RM Amaku M, Yai LEO, Dubey JP, Gennari SM (2005). First isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from finishing pigs from São Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology*. 131: 207–211. DOI: 10.1016/j.vetpar.2005.04.039
- Silva RC, Langoni H, Su C, Silva AV (2011). Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* in sheep from Brazilian slaughterhouses: new atypical genotypes and the clonal type II strain identified. *Vet Parasitol*, 175: 173-177. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.09.021
- Su C, Zhang X, Dubey JP (2006). Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCRRFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites. *International Journal for Parasitology*. 36: 841-848. doi:10.1016/j.ijpara.2006.03.003
- Su C, Shwab EK, Zhou P, Zhu X Q, Dubey JP (2010). Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol*, 137: 1-11. doi: 10.1017/S0031182009991065

Velmurugan GV, Dubey JP, Su C (2008). Genotyping studies of *Toxoplasma gondii* isolates from Africa revealed that the archetypal clonal lineages predominate as in North America and Europe. *Vet Parasitol*, 155: 314–318. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.04.021

Yai LE, Ragozo AM, Soares RM, Pena HF, Su C, Gennari SM. (2009). Genetic diversity among capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) isolates of *Toxoplasma gondii* from Brazil. *Vet Parasitology*.:DOI 10.1016/j.vetpar.2009.03.007

Zhou P, Zhang H, Lin RQ, Zhang DL (2009). Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from China. *Parasitol. Int.* 58: 193-195. doi:10.1371/journal.pone.0104930

Zhou P, Sun XT, Yin CC, Yang JF, Yuan ZG, Yan HK, Zhu XQ, Zou FC (2011). Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs in southwestern China. *Journal of Parasitology* 97, 1193–1195. .doi.org/10.1645/GE-2465

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho foi pioneiro no isolamento do *Toxoplasma gondii* em suínos de criações de subsistência no Estado de Pernambuco. Contudo, esse é o primeiro passo para que novos estudos mais aprofundados e abrangendo um maior número de amostras e regiões sejam realizadas para promover ações preventivas do controle da toxoplasmose em suínos.

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que os suínos abatidos no Estado de Pernambuco, Brasil estão expostos à infecção por *Toxoplasma gondii*. Estes resultados são importantes do ponto de vista de saúde pública, visto que a carne suína é uma importante fonte de infecção de *T. gondii* para seres humanos. Ressalta-se que nesse estudo, a partir de apenas 50 gramas de tecidos suínos, foi possível isolar o parasito com capacidade infectante, essa quantidade de carne é bem inferior ao consumo diário de um adulto, esse dado demonstra o risco que a população da região estuda está exposta.

Além desse fator importante para a saúde pública, a partir da caracterização genotípica do isolado foi possível identificar pela primeira vez o genótipo #65, ToxoDB em suínos no Brasil e no mundo, confirmando o caráter atípico dos isolados brasileiros.

APÊNDICES

Questionário Investigativo sobre as criações de subsistência na região Agreste do Estado de Pernambuco

Nome da propriedade:

Proprietário:

Telefone:

Município:

Data:

Dados do Proprietário:

01) Qual tipo de alimentação é fornecida ao rebanho?

- a) ração
- b) restos de comida
- c) mista

02) Qual sistema de criação estão os animais?

- a) Intensivo
- b) Extensivo
- c) Misto

03) Existem gatos na propriedade? Os leitões consomem colostro?

- a) Sim
- b) Não
- c) Não sabe informar

Quadro 1 – Resultados do exame histopatológico em tecidos de suínos abatidos no Agreste Pernambucano, 2013.

ID	Histopatologia Suínos			
	Pulmão	Coração	Fígado	SNC
5303	Proliferação do BALT	S/A	S/A	S/A
5394	S/A	S/A	Presença de eosinófilos no espaço interlobular	S/A
5396	Proliferação do tecido linfoide associado ao brônquio (BALT)	S/A	S/A	S/A
5397	Áreas com espessamento de alvéolos	S/A	S/A	S/A
5398	Áreas com espessamento de alvéolos e hipertrofia de músculo liso	S/A	S/A	S/A
5400	Áreas com espessamento de alvéolos e hipertrofia de músculo liso	S/A	S/A	S/A
5405	Áreas com espessamento de alvéolos e hipertrofia de músculo liso	S/A	S/A	S/A
5406	Áreas com espessamento de alvéolos	S/A	S/A	S/A
5407	espessamento de alvéolos, com leve infiltração de eosinófilos, leve enfisema e presença de exudato neutrofílico na luz de bronquíolos	Presença de Sarcocystis sp	S/A	S/A
5408	Áreas com espessamento de alvéolos e infiltração mononuclear	S/A	Presença de eosinófilos no espaço interlobular	S/A
5410	Áreas com espessamento de alvéolos e infiltração mononuclear	S/A	presença de eosinófilos no espaço interlobular	S/A

5412	S/A	S/A	presença de eosinófilos no espaço interlobular	S/A
			Presença de hemossiderina no citoplasma	
5413	Áreas com espessamento de alvéolos e hipertrofia de músculo liso	S/A	S/A	
5414	Áreas com espessamento de alvéolos e hipertrofia de músculo liso e proliferação do BALT	S/A	S/A	S/A
5415	Áreas com espessamento de alvéolos e hipertrofia de músculo liso	S/A	Presença de eosinófilos no espaço interlobular	S/A
5417	S/A	S/A	Presença de eosinófilos no espaço interlobular	S/A
5418	Áreas com espessamento de alvéolos e hipertrofia de músculo liso	S/A	S/A	S/A
239	S/A	S/A	S/A	S/A
240	Leve espessamento dos alveolos	S/A	S/A	Foco de calcificação na meninge
241	S/A	S/A	S/A	Infiltrado eosinofílico perivascular leve
251	S/A	S/A	S/A	S/A
252	S/A	S/A	Infiltração por eosinófilos no espaço porta moderado	S/A
254	Infiltrado mononuclear peribronquiolar leve	S/A	S/A	S/A
256	infiltração por células mononucleadas perivascular leve	Focos de infiltração por células mononucleadas leve	Infiltrado eosinofílico perivascular leve	Foco de calcificação

Legenda: S/A sem alteração

Quadro 2 – Resultados de exame histopatológico para tecidos de camundongos utilizados no bioensaio, Pernambuco 2013.

ID	Histopatologia Camundongos			
	Pulmão	Coração	Fígado	SNC
5350	S/A	S/A	Focos de infiltração mononuclear	S/A
5352	S/A	S/A	Perivasculite mononuclear	S/A
5353	S/A	S/A	Foco de infiltração mononuclear	Perivasculite leve
5354	S/A	S/A	Células de Kupfer ativado	Perivasculite pontual
5355	Proliferação do BALT	S/A	Leve perivasculite e infiltração mononuclear	S/A
5356	S/A	S/A	Foco de infiltração por eosinófilos	S/A
5357	S/A	S/A	Leve infiltração mononuclear e leve perivasculite	S/A
5358	Infiltração por mono e polimorfonucleares	S/A	Focos de infiltração mononuclear , perivasculite leve	S/A
5361	S/A	S/A	Vacuolização de hepatócitos na região centro lobular	S/A
5362	S/A	S/A	Focos de infiltração mononuclear	S/A
5369	Proliferação do BALT	S/A	S/A	S/A
5376	S/A	S/A	Presença de glóbulos de gordura	S/A
5377	S/A	S/A	Focos de infiltração mononuclear	S/A
5384	S/A	S/A	Vacuolização dos hepatócitos ao redor da veia centro lobular	S/A
5397	S/A	S/A	S/A	Leve perivasculite focal
5420	S/A	S/A	Focos de infiltração mononuclear	S/A
A4G1	S/A	S/A	Focos de infiltração por células mononucleares perivascular leve	S/A
A5G1	S/A	S/A	Focos de infiltração por células mononucleares perivascular leve	S/A
A2G1	S/A	S/A	Focos de infiltração por células mononucleares leve	S/A

A5G2	Infiltração mononuclear perivascular	S/A	Focos de infiltração por células mononucleares perivascular leve	S/A
A4G2	S/A	S/A	Focos de infiltração por células mononucleares perivascular leve	S/A
A2G3	Espessamento dos alvéolos	S/A	S/A	S/A
A2G2	S/A	S/A	Focos de infiltração por células mononucleares perivascular leve e por células polimorfonucleares no parênquima	S/A
A3G2	Alguns macrófagos contendo grânulos basofílicos no citoplasma	S/A	Presença de glóbulos de gordura no citoplasma	S/A

Legenda: S/A sem alteração

ANEXOS

J. Parasitol., 2008,

_ American Society of Parasitologists 2008

THE JOURNAL OF PARASITOLOGY

POLICY AND GUIDELINES FOR AUTHORS

The *Journal of Parasitology* is the official journal of the American Society of Parasitologists (ASP). The *Journal* is nonprofit and dues of the membership support the cost of publication.

Manuscripts in English are accepted from investigators in any country regardless of whether they are members of the Society.

The *Journal* publishes official business of the ASP and results of new, original research, primarily on parasitic animals.

POLICY

Conditions of acceptance

Manuscripts are received by *Journal of Parasitology* with the understanding that:

- 1) all authors have approved submission;
- 2) the results or ideas contained therein are original;
- 3) the work has not been published previously;
- 4) the paper is not under consideration for publication elsewhere and will not be submitted elsewhere unless rejected by the

Journal of Parasitology or withdrawn by written notification

to the editor of the *Journal of Parasitology*;

- 5) if accepted for publication and published, the article, or portions thereof, will not be published elsewhere unless consent is obtained in writing from the editor of the *Journal of Parasitology*;
- 6) reproduction and fair use of articles in the *Journal of Parasitology* are permitted in accordance with the United States Copyright Revision Law (PL94–533), provided the intended use is for nonprofit educational purposes. All other use requires consent and fees where appropriate;
- 7) the obligation for page charges and redaction fees is accepted by the authors.

Articles reporting original research, invited reviews, and research notes are evaluated by at least 2 anonymous reviewers selected by an associate editor. Critical comments are reviewed and

published on the judgment of the editor. The final decision of whether to publish is made by the editor after reviews and opinions of the editorial board are considered.

Animal care and use

The ASP conforms to the ‘‘U.S. Government Principles for the Utilization and Care of Vertebrate Animals Used in Testing, Research and Training.’’ Work involving vertebrate animals reported in any paper submitted to the *Journal of Parasitology* must have been conducted within the following guidelines adapted from a statement by The American Association for Laboratory Animal Science (1989, *Laboratory Animal Science* **39**: 267).

1) The transportation, care, and use of animals for research and teaching must conform with the appropriate national guidelines (in the U.S.A., the Animal Welfare Act) and other applicable laws, guidelines, and policies. Authors should refer to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (U.S. DHEW Publication Number [NIH] 86–23, as revised in 1985 or subsequently).

2) Experiments using animals should be designed and conducted with full consideration given for their relevance to human or animal health, the acquisition of knowledge, or the welfare of society.

3) Animal species selected for experimentation must be appropriate for the results expected, and the number used should be the minimum justified by sound statistical analysis.

4) All experimental and maintenance procedures require the avoidance of creating conditions that would lead to animal discomfort, distress, or pain, consistent with sound scientific practices.

5) If animals are to be subjected to momentary distress or pain, appropriate anesthesia must be employed. Painful experiments must not be conducted on unanesthetized animals that have been paralyzed by chemicals or other procedures.

6) Animals used in experiments that cause chronic pain or distress must be killed as soon as the experiments are concluded.

7) Veterinary care for laboratory animals is essential. Animals maintained in the laboratory must be kept in conditions appropriate for that species and under conditions that contribute to their health and comfort.

8) All persons using laboratory animals should be well trained for the conduct of experiments on living animals.

9) When exceptions to these principles are required, decisions regarding animal use must be made by the appropriate institutional animal care and use committee.

10) The use of animals obtained from natural populations must be in accordance with regulations and policies of appropriate federal or state agencies.

Page charges and redactory fees

The first 3 pages of each published manuscript are without charge. The charge for pages in excess of three shall be \$45 per published page for articles with at least one author who is a member, and \$75 per published page for articles with no authors who are members. Nonmembers intending to publish in the Journal of Parasitology are encouraged to become members of the Society. The current annual dues are \$75.00 (students \$35.00). Authors are allowed five alterations free of charge. Each subsequent alteration costs \$5.00. Authors are reminded that added or removed characters may necessitate other corrections. If you have included figures in color, then please note that the cost of a color plate is \$500 for printed copy, and \$75 for online version only, and is the responsibility of the authors. So please let us know if the figures should be printed in color or not, and if they should be in the printed/online versions or both. If they are not to be printed in color it would be best to replace them with Black and White figures at this stage. If you are unable to do so, Allen Press will convert them to Black and White. These charges are subject to change without notice.

Return of materials

Rejected papers: When the decision is made not to publish a paper, the original typescript and illustrations are returned to the author with the author's copy of the reviews and a cover letter. All other materials are destroyed. Rejected manuscripts are not reconsidered.

Papers returned for revision: Materials necessary for reference or to be revised are returned to the author at the time a revision is requested. If the revision is not received within 6 mo, or if other arrangements have not been made with the editor, the manuscript is considered to have been withdrawn and the materials are destroyed.

Forms of publication

Articles: The Journal publishes articles reporting original research, primarily on parasitic animals.

Research notes: This form of publication represents discrete, definitive information (as opposed to preliminary results) that does not lend itself to inclusion in a typical, more comprehensive article. A new or modified technique may be presented as a research note only if the technique is not to be used in ongoing studies. Ordinarily, techniques are incorporated into the materials and methods section of a regular article. The Journal will no longer publish notes that deal with host

or location records, except for the most unusual cases; if a prospective author has an exceptional case, he/she should first contact the Editor to determine the paper's potential acceptability.

Review articles: Only invited reviews are published. Unsolicited reviews should not be submitted, but topics may be suggested to the editor or members of the editorial board.

Critical comments: Critical comments are for correcting errors of published fact, providing alternative interpretations of published data, or presenting new theories based on published information.

Book reviews: Books having a broad interest to the membership of the Society are reviewed by invitation.

GUIDELINES FOR AUTHORS

Electronic submission

The *Journal of Parasitology* accepts papers online via our AllenTrack arrangement with Allen Press. Authors are encouraged to submit manuscripts from an Internet-connected computer, with any operating system and any platform, anywhere in the world, day or night. In preparing your manuscript for submission, please use the guidelines printed in the February issue of the *Journal of Parasitology* every other year. The system will allow authors to check the status of their manuscript and add updated files at a later date. The only software required is the Adobe Acrobat Reader (available for free from www.adobe.com). Authors not wishing to submit via the AllenTrack system may continue to submit hard copies to the editorial office by ordinary mail or courier service.

Like all submissions, access to papers submitted electronically is strictly controlled by login and user privileges, thus assuring authors that their papers are secure and inaccessible to anyone except the editor or his designee.

To submit a paper via the Internet, the following procedure should be used: Go to <http://jparasitology.allentrack.net>. The first time you use the system you will register for an account. You will use your account login and password when you return to the site to check on the status of your paper.

The first time you log on, you will have 2 choices (1) Submit a Paper, or (2) Author Guidelines. (Please examine the

Guidelines carefully—they will save you time and help you make the best use of the system.)

After you submit the paper, you will have a third option that links you to information on your submission. Once your files are uploaded to the database, they are converted as needed to PDF files that can be viewed, downloaded, and printed. Most word processing files, e.g., Word,

Word- Perfect, text, Postscript, and rich format, are convertible. Word (MS word) for the text, is what we prefer.

Figures can be uploaded in JPEG, TIFF, GIF, EPS, PDF, or Postscript formats. Line art, halftones, and color figures should be scanned as follows: grayscale/halftone images should be scanned at 450 dpi, color figures should be scanned at 300 dpi; and line art should be scanned at 1200 dpi. **PLEASE NOTE** that all figures should be submitted as separate files and **NOT** part of the text. When your ms. has been accepted for publication we may ask that hard copies of your figures be mailed to the Editorial Office. The reason for this request is related to the enormous variation in the quality of printers used in reproducing figures during scanning. With original hard copies in hand, we can ensure quality reproduction.

The system will ask you to confirm that the files have been converted correctly, i.e., check your files to make sure the system converted each element properly. Your paper will be considered as officially submitted only after the system receives your confirmation. As you go through the steps, watch for red arrows. These tell you that you need to take action on something. Converting your files should take just a few minutes, but occasionally they will take longer. Conversion time may vary with your connection.

In any case, you are no longer required to make multiple copies of your text and figures, or package your manuscript, or ship it via regular mail service to the editorial office. Most importantly, it will be delivered instantaneously!

When the paper is in the system we will assign it a tracking number and an associate editor to whom it will be transferred electronically from our office. Once the associate editor has it, the manuscript will be sent immediately, by electronic means, to appropriate referees.

Hard copy submission

All manuscripts must be prepared and submitted according to the guidelines of this section and those of the subsequent section appropriate for the category of the report.

Paper: Manuscripts are to be typed on one side only of good quality, white paper. Thin onion skin or rice parchment papers are **not** acceptable. *Typing:* **All parts of original manuscripts** are to be typed double-spaced (no more than 3 lines/25 mm), with all margins being at least 25 mm wide. Type should be at least 12 point (elite); **photoreduction, even in tables, is not acceptable.**

Proportional spacing and hyphenation should not be used, i.e., do not justify right-hand margin. Do not leave extra space between paragraphs in the text. Only a single font should be used; genera and species should be in italics. Authors' names in the literature cited section should be

typed with capitals for the initials and first letter of the last name and lowercase for all other letters (despite the fact that these names are printed in large and small capital letters in the Journal).

Submission: For a new manuscript, submit the original and 3 copies prepared according to the Policy and Guidelines contained herein. When a manuscript has been accepted for publication by the editor, specific instructions for preparation of the revision on a diskette will be supplied. Please note that if it is not possible to prepare the revision on a diskette, then 2 hard copies of the revision prepared according to the Policy and Guidelines statement will be suitable. It remains the responsibility of the author to retain a copy of the manuscript for reference and to protect against loss. Manuscripts should be addressed to: Dr. Gerald W. Esch, Editor, Journal of Parasitology, Department of Biology, Wake Forest University, P.O. Box 7629, Winston-Salem, North Carolina 27109.

Articles

Manuscripts are to be organized in the following format and sequence, with all pages, beginning with that for the running head, numbered consecutively.

Running head: Provide the last names of authors (use et al. for more than 2) and a shortened title. The entire running head may not exceed 60 characters and spaces. Style: RH: JONES ET AL.—LIFE CYCLE OF *H. DIMINUTA*

Title: Immediately after the running head give the title of the article, names of authors, and address of the first author. Include the email address, in italics, of the corresponding author only. The title and authors' names should be in bold type, and the same font size as the text. All other information should be in roman type. Titles should be short and descriptive. Avoid "empty words" such as preliminary studies on . . . and biology or ecology of Do not use author and date citations with scientific names in the title. **In the title only**, numbers less than 11 are spelled out; numbers indicating papers in a series will not be accepted. Present addresses and addresses for remaining authors, if different from that of the first author, are given as footnotes, and are to follow the Figure Legends with one space between the legends and the footnotes. You should also designate who the corresponding author is by using one of the footnote designations. Footnote designations are as follows: *, †, ‡, §, __, #, ¶, **, ††. (See examples [pp. 227–229] at end of guidelines.)

Abstract: This should follow directly after the author's address with no additional spacing between them. You should provide an abstract of the paper that does not exceed 200 words.

The abstract should be factual (as opposed to indicative) and should outline the objective, methods used, conclusions, and significance of the study. The abstract is headed with the word abstract, indented, and typed in bold capital letters, ending with a colon also in bold type. Text is run in after the colon, is not subdivided, and does not contain literature citations.

Introduction: The introduction should follow the abstract and should be un-headed. The introduction should establish the context of the paper by stating the general field of interest, presenting findings of others that will be challenged or developed, and specifying the specific question to be addressed. Accounts of previous work should be limited to the minimum information necessary to give an appropriate perspective. The introduction may not be subdivided and extra spacing between paragraphs is not permitted here or throughout the text.

Materials and methods: This section should give sufficient information to permit repetition of the study by others. Methods and apparatus used should be indicated, but specific brand names and models need to be mentioned only if significant. The source, e.g., city and state, both spelled in full, of special equipment or chemicals should also be given. Previously published or standard techniques are to be referenced, but not detailed. Generic descriptions should be given for unusual compounds used. The primary heading for this section should be typed in all bold capital letters and started at the left-hand margin of the page. The heading is unnumbered and ends without punctuation. Second-level headings in bold type should be on a separate line beginning at the left-hand margin. The initial letter of the first word is the only capital letter except capitals needed for proper nouns. These headings are unnumbered and end without punctuation. Third-level headings are indented for a paragraph, italicized, and end with a colon, also italicized. The initial letter of the first word is the only capital letter, except capitals needed for proper nouns. Text is run in immediately following this heading. Further subdivision should not be needed. If the materials and methods section is short, it should not be subdivided; it is unnecessary to provide headings, beyond the primary head, for a series of subsections comprising single paragraphs.

Results: This section should contain a concise account of the new information. Tables and figures are to be used as appropriate, but information presented in them should not be repeated in the text. Avoid detailing methods and interpreting results in this section. The results section may be subdivided and headed as for the materials and methods section. Taxonomic papers have a distinct style that must be adhered to in preparing a manuscript. In **taxonomic papers** the results section is to be replaced by a section headed **DESCRIPTION**, beginning at the left-hand margin. The primary heading is followed by the italicized scientific name in bold type of the

taxon studied; it begins at the left-hand margin. Synonyms and reference to figures follow, each as a separate line at the left-hand margin (these are not in bold type or italicized). The text of the description follows as a new paragraph beginning with *Diagnosis*.

The description is followed with a **taxonomic summary** section, headed as described for second-level headings in the instructions for the materials and methods section. The taxonomic summary section comprises a listing of the type host, other hosts, site, locality, and specimens deposited. Each of these topics is headed as a third-level heading, e.g., italicized, and indented as described for the materials and methods section.

The *Host* subsection must include the full scientific name of the host, the authority's name, and an indication if *Symbiotype* specimens were deposited in a vertebrate museum along with accession numbers. The *Locality* should include map coordinates as well as the name of the locality, e.g., ocean, river, etc., and the geopolitical region. *Prevalence and density* data are included when known. The taxonomic summary is followed by a remarks section, headed as described for secondlevel headings in the instructions for the materials and methods section.

The **remarks** section replaces the discussion of other articles and gives comparisons to similar taxa; it is typed in boldface and begins at the left margin. The first letter is capped and the rest are lowercase. This sequence of subsections is repeated for each taxon. If in taxonomic papers the description section does not comprise all of the results and discussion, the format outlined is to be incorporated into the usual section of results.

Museum accession numbers for appropriate type material (new taxa) and for voucher specimens (surveys) are required; if deposited in the U.S. National Parasite Collection at Beltsville, Maryland, the accession number is preceded by the acronymUSNPC No. Appropriate photographic material should be deposited for descriptions of coccidia. Frozen tissues must also include accession numbers if deposited in a museum.

Discussion: An interpretation and explanation of the relationship of the results to existing knowledge should appear in the discussion section. Emphasis should be placed on the important new findings, and new hypotheses should be identified clearly. Conclusions must be supported by fact or data.

All letters in **DISCUSSION** are boldfaced, capped, and started at the left-hand margin. The primary heading and subdivisions, if needed, in this section are as described for the materials and methods section.

Acknowledgments: These should be concise. Ethics require that colleagues be consulted before being acknowledged for their assistance in the study. The heading for this section is as for the primary head described for the materials and methods section.

Subdivisions are not used in this section.

Literature cited: Citations are arranged alphabetically. All references cited in the text must appear in the literature cited section, and all items in this section must be cited in the text. Citation of unpublished studies or reports is not permitted, i.e., a volume and page number must be available for serials and a publisher, city, state, and full pagination for books. Abstracts not subjected to peer review may not be cited. Work may be cited as “in press” only if proof has been produced. If absolutely necessary, a statement may be documented in the text of the paper by “pers. comm.,” providing a copy of that page signed by the person cited accompanies the manuscript. In those cases, the citation is indicated in the style: (X. Y. Smith, pers. comm.).

Personal communications do not appear in the literature cited section. Do not indent anything; Allen Press has a computer program that will handle all citations and indent as appropriate.

Style in the text:

(Allen, 1989)

(Allen and Smith, 1989)

(Allen et al., 1989)(Jones, 1987; Allen, 1989)—chronological (Jones 1987; Allen, 1989; Smith, 1989)—chronological and alphabetical within year (Jones, 1987, 1988a, 1988b, 1989) Multiple authors with the same year of publication should be (Smith, Jones et al., 1988; Smith, Walker, and Jones, 1988), **not** (Smith et al., 1988a, 1988b) Style in the literature cited section (note that indentations are no longer required): Journal article, 1 author Nollen, P. M. 1990. Chemosensitivity of *Philophthalmus megalurus* (Trematoda) miracidia. *Journal of Parasitology* **76**: 439–440. Journal article, 2 authors Edwards, D. D., and A. O. Bush. 1989. Helminth communities in avocets: Importance of the compound community. *Journal of Parasitology* **75**: 225–238.

Book Schmidt, G. D., and L. S. Roberts. 1989. *Foundations of parasitology*, 4th ed. Times Mirror/Mosby College Publishing Company, St. Louis, Missouri, 750 p.

Chapter in edited book Nesheim, M. C. 1989. Ascariasis and human nutrition. *In* Ascariasis and its prevention and control, D. W. T. Crompton, M. C. Nesbemi, and Z. S. Pawlowski (eds.). Taylor and Francis, London, U.K., p. 87–100. Thesis or dissertation Monks, W. S. 1987. Relationship between the density of *Moniliformis moniliformis* and distribution within the

definitive host population. M.S. Thesis. University of Nebraska- Lincoln, Lincoln, Nebraska, 64 p.

Note that abbreviations are not used for titles or serial publications and that spaces appear between initials. The literature cited section has a primary heading as described for materials and methods.

Footnotes: Footnotes are used only for the title page of regular articles to indicate authors' addresses and to whom correspondence should be sent. Those for tables are typed directly under the table to which they pertain. Footnotes appear at the end of the manuscript directly after the Figure Legends (see example at end of guidelines).

Tables: Tables are used only to present data that cannot be incorporated conveniently into the text. Ordinarily values from statistical tests are not published as tables; tests employed and probability accepted for significance can be stated in the materials and methods section with significant differences indicated in tables by footnotes or in the text by a statement.

Tables must be designed to fit in 1 or 2 columns. Only rarely may they be designed to fit the height of a printed page.

Generally, if the width does not fit the height of a typed page, the table is too wide. Tables may be continued on following pages to accommodate length, but pages may not be taped together, photoreduced, single-spaced, oversized, or otherwise modified to contain more material.

Tables are numbered with Roman numerals in a continuous series and so referenced, in sequence, in the text. Captions are typed above the data on the same page. Species names are spelled out in full (and italicized) the first time used in each caption. All columns in a table must have headings, with the first letter of the first word and proper nouns capitalized, e.g., Number sampled, % Recaptured.

Horizontal lines should be avoided in the body of the table; vertical lines are not permitted. If such symbols are necessary, the table must be prepared as a line drawing and treated as a figure. Use of letters and numbers as superscripts or subscripts is not permitted. Table designations must be used in the obligate sequence that follows: *, †, ‡, §, ‒, #, ¶, **, ††.

Figures: All figure captions are to appear consecutively, in sequence, directly after the literature cited section. Do not place figure captions on the same page as the figures. Each figure or plate of figures must have a caption. The caption is written in paragraph style, beginning with the word "FIGURE." Captions are typed in roman, except when italic type is required, e.g., a genus and species. For plates, a summary statement should precede the specific explanation of each figure. Avoid repeating information for each figure that can be placed in the summary statement.

Species names are spelled out in full the first time used in each caption. The caption must contain an explanation of all abbreviations used on the figures and indicate the value of lines or bars used to show size (unless the value is shown directly on the figure). Size should not be indicated by magnification in the caption because the figure might not be printed at the size calculated. Figures are numbered consecutively in the sequence mentioned in the text. Nonparenthetical references to figures in the text are not abbreviated, i.e., Figure 1; Figures 1, 2; Figures 1–3; references to figures in parentheses in the text are abbreviated, i.e., Fig. 1, Figs. 1, 2; Figs. 1–3. All symbols used in a figure must be defined when possible by a key within the body of the figure. Style, including the form of abbreviation, must be that used in the *Journal*. When symbols are set in the caption, the following are available:

Others require artwork and the additional expense may be billed to the author. Freehand labeling of figures is not acceptable.

Figures may be used singly or grouped in a plate. In either case, the originals must be mounted on illustration board with a margin of at least 25 mm on all sides. Photographs and line drawings may not be combined in a single plate. If such a composition is necessary, the additional expense may be billed to the author. All figures are to be identified on the back by author name and figure number with the top indicated. Single figures are not numbered on the front, but each figure in a plate must include a number or letter, applied directly to the figure and, when possible, without an added background. Figures arranged to form a plate are to be abutted tightly without space or masking between.

Figures and plates are printed in 1 (88 mm wide) or 2 (182 mm wide) columns. Length may be up to 229 mm, but in practice it should be shorter to allow room beneath for the caption as published in the *Journal*. Publication may be delayed if the caption cannot be included on the same page as the figure(s).

Correcting proof and ordering reprints

Authors are responsible for the accuracy of their proofs and, therefore, what ultimately is printed in the *Journal*. **Corrected proofs must be returned to the editor promptly**, ideally on the same day as received. Receipt of proof is not acknowledged; authors are notified when proof is not received. Proofs are to be corrected, not revised. Additions usually are disallowed except to correct errors made in typesetting and by the editor.

Correction of errors made by the author may be billed to the author at the rate of \$5.00 each. Queries on the proof are to be answered by “yes” or “no”; do not use “ok” or “stet.”

A form for ordering reprints accompanies the proof. Only the author designated to receive correspondence receives proof and reprint order forms. It is the responsibility of this author to clear the proof with other authors and to provide the opportunity for them to order reprints.

Reprint orders are to be returned to Allen Press at the address on the form. Orders received after printing of the issue containing the article cannot be filled.

SCHEDULE FOR PRINTING INSTRUCTIONS

These instructions, or a revision, will be printed in the February issue of the *Journal* every 2 years. Reprints are available from the editor, or they can be found online at: <http://asp.unl.edu>.

ACKNOWLEDGMENTS

These instructions are a revision of policies and practices formulated by previous editors. The staff at Allen Press, especially Annielaurie Seifert, contributed ideas and advice for the revision.

Gerald W. Esch, Department of Biology, Wake Forest University, P.O. Box 7629, Winston-Salem, North Carolina 27109.



GUIDE FOR AUTHORS

Your Paper Your Way

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

To find out more, please visit the Preparation section below.

INTRODUCTION

Acta Tropica publishes original research papers, short communications and review articles. Original papers **should normally not exceed 10 printed pages** including tables and figures. Short communications should not exceed 4 printed pages including tables and figures. Manuscripts must be accompanied by a letter signed by all the authors. Submission of a paper to *Acta Tropica* is understood to imply that it has not previously been published (except in an abstract form), and that it is not being considered for publication elsewhere. The act of submitting a manuscript to *Acta Tropica* carries with it the right to publish the paper. Responsibility for the accuracy of the material in the manuscript, including bibliographic citations, lies entirely with the authors.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

This journal offers authors a choice in publishing their research: Open access and Subscription. *For subscription articles*

AUTHOR INFORMATION

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more information on author rights for:

Subscription articles please see

<http://www.elsevier.com/journal-authors/author-rights-and-responsibilities>.

Open access articles please see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit

<http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An open access publication fee is payable by authors or their research funder

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)
- No open access publication fee

All articles published open access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY): lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA): for noncommercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA).

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND): for noncommercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

To provide open access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published open access.

Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The open access publication fee for this journal is **\$1,800**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific

English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

PREPARATION

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file.

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier:

<http://www.elsevier.com/guidepublication>). See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the

text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the

Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately

from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Please provide, when submitting your article, a graphical abstract. This comprises the title, authors and affiliations, identical to the article itself, a summary of about 25 words, and a pictogram: one figure representative of the work described. Maximum image size: 400 × 600 pixels (h × w, recommended size 200 × 500 pixels). Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See

<http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research.

Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article:

Database: xxxx

(e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See

<http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files. A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below): EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'. TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi. TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications that can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Illustration services

Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/illustrationservices>) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do

wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
 2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
 3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.
- Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al.

(2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations: <http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>.

Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research.

Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, highresolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including

ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Google Maps and KML files

KML (Keyhole Markup Language) files (optional): You can enrich your online articles by providing KML or KMZ files which will be visualized using Google maps. The KML or KMZ files can be uploaded in our online submission system. KML is an XML schema for expressing geographic annotation and visualization within Internet-based Earth browsers. Elsevier will generate Google Maps from the submitted KML files and include these in the article when published online. Submitted KML files will also be available for downloading from your online article on ScienceDirect. For more information see

<http://www.elsevier.com/googlemaps>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)

Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white

- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.

- For reproduction in black-and-white, please supply black-and-white versions of the figures for printing purposes.

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor.

Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).

AUTHOR INQUIRIES

You can track your submitted article at http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/89/p/804/.

You can track your accepted article at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>